

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Charité Universitätsmedizin Berlin

## Dissertation

# **Mastzellen sind entscheidend an der Thrombin-induzierten kutanen Entzündungsreaktion beteiligt**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Diplom-Humanbiologin Cathleen Annett Sünder

Dekan: Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch  
2. PD Dr. rer. nat. Susanne Hartmann  
3. Prof. Dr. med. Marcus Maurer

eingereicht: 05.05.2011  
Datum der Promotion: 30.08.2011

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>0</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>X</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Mastzellen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Charakterisierung und Differenzierung .....	1
1.1.2	Mastzellaktivierung und Mastzellprodukte .....	2
1.1.3	Physiologische und pathophysiologische Wirkung.....	3
1.1.4	Primäre murine <i>in vitro</i> Mastzellmodelle .....	6
1.1.5	Mausmodelle.....	7
1.1.5.1	MZ-defiziente Mäuse .....	7
1.1.5.2	Spezifischer „knock out“ von MZ-Proteasen .....	8
1.1.5.3	Wiederherstellung der MZ-Population .....	8
<b>1.2</b>	<b>Die Serinprotease Thrombin .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Generierung, Funktion und Hemmung von Thrombin im Rahmen der .....	
	Gerinnungskaskade .....	9
1.2.2	Zelluläre Funktionen der Serinprotease Thrombin durch die Interaktion mit .....	
	Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren .....	9
<b>1.3</b>	<b>Proteinase aktivierbare Rezeptoren .....</b>	<b>11</b>
1.3.1	Einführung.....	11
1.3.2	Aktivierung und Abbau .....	11
1.3.3	Physiologische und pathophysiologische Wirkungen.....	13
1.3.3.1	Proteinase aktivierbarer Rezeptor 1 .....	13
1.3.3.2	Proteinase aktivierbarer Rezeptor 2 .....	13
1.3.3.3	Proteinase aktivierbarer Rezeptor 3 .....	14
1.3.3.4	Proteinase aktivierbarer Rezeptor 4 .....	14
1.3.4	Synthetische Agonisten und Antagonisten der Proteinase-aktivierbaren .....	
	Rezeptoren.....	15
1.3.4.1	Agonisten .....	15
1.3.4.2	Antagonisten .....	15
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Laborgeräte .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Reagenzien und Chemikalien.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Kits.....</b>	<b>22</b>

---

<b>2.5</b>	<b>Medien .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>25</b>
<b>2.8</b>	<b>primäre Zellen, Zelllinien, Mäuse .....</b>	<b>26</b>
<b>2.9</b>	<b>Software.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellbiologische Arbeiten .....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Primäre Zellen.....	28
3.1.1.1	Isolation und Kultivierung knochenmarksgenerierter Mastzellen.....	28
3.1.1.2	Isolation und Kultivierung peritonealer Mastzellen .....	28
3.1.2	Zellzählung.....	29
3.1.2.1	Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau Färbung .....	29
3.1.2.2	Mastzell-spezifische Färbung .....	29
3.1.3	Zelllinien .....	30
3.1.3.1	Hybridomzellen X63 .....	30
3.1.4	Aufreinigung der kultivierten peritonealen Mastzellen PCMCs.....	30
3.1.4.1	Dichtegradientenzentrifugation .....	30
3.1.4.2	Aufreinigung über magnetische Partikel .....	30
3.1.4.2.1	Negative Aufreinigung mittels EasySep® PE-selection Kit.....	30
3.1.4.2.2	Positive Aufreinigung mittels MACS CD117 MicroBeads .....	31
3.1.4.3	Durchflusszytometrische Sortierung .....	31
<b>3.2</b>	<b>Tierexperimentelle Arbeiten .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Versuchstiere .....	32
3.2.2	Rekonstitution von MZ-defizienten C57BL/6 <i>Kit<sup>W-sh/W-sh</sup></i> Mäusen mit BMCMC .....	32
3.2.3	<i>In vivo</i> Untersuchung der Stimulation von kutanen Mastzellen .....	33
<b>3.3</b>	<b>Histologische Arbeiten .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Herstellung von Paraffinblöcken und Paraffinschnitten.....	33
3.3.2	Herstellung der Semidünnschnitte.....	34
3.3.3	Haemalaun-Eosin-Färbung .....	34
3.3.4	Giemsa-Färbung .....	34
3.3.4.1	Paraffinschnitte.....	34
3.3.4.2	Semi-dünn Schnitte .....	34
<b>3.4</b>	<b>Proteinchemische Arbeiten.....</b>	<b>35</b>
3.4.1	β-Hexosaminidase-Assay.....	35
3.4.2	Nachweis der Thrombinaktivität.....	35
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten .....</b>	<b>36</b>
3.5.1	RNA Aufreinigung.....	36

3.5.2	Die Polymerase-Kettenreaktion .....	36
3.5.3	Primerdesign .....	37
3.5.4	Expressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion .....	38
3.5.5	Real-time quantitative PCR .....	40
<b>3.6</b>	<b>Immunologische Arbeiten .....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Durchflusszytometrie .....	41
3.6.1.1	Durchflusszytometrische-Analyse der Mastzellen .....	41
3.6.2	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	42
<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Reinheit der Mastzellen .....</b>	<b>44</b>
4.1.1	Knochenmarks-generierte kultivierte Mastzellen stellen eine reine, homogene Zellpopulation dar .....	44
4.1.2	Peritoneale, kultivierte Mastzellen müssen aufgereinigt werden .....	44
4.1.2.1	Die Aufreinigung von peritonealen, kultivierten Mastzellen über einen Dichtegradienten führt nicht zu einer ausreichenden Reinheit .....	45
4.1.2.2	Die Aufreinigung von peritonealen, kultivierten Mastzellen über einen Magneten führt nicht zu einer ausreichenden Reinheit .....	46
4.1.2.3	Die Sortierung von peritonealen, kultivierten Mastzellen am Durchfluss- zytometer führt zu einer hochreinen Mastzellpopulation .....	47
<b>4.2</b>	<b>PCMC und BMCMC exprimieren die Thrombinrezeptoren PAR1, 3 und 4 auf mRNA Ebene .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Aktivierung von Mastzellen.....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Mastzellen setzen nach Stimulation mit der PAR aktivierenden Serinprotease. Thrombin $\beta$ -Hexosaminidase frei.....	48
4.3.2	Mastzellen setzen nach Aktivierung von PAR1 oder PAR4 $\beta$ -Hexosaminidase frei.....	50
4.3.3	Mastzellen setzen nach Inkubation mit PAR antagonistischen Peptiden und.... einem chemischen Antagonisten $\beta$ -Hexosaminidase frei.....	52
4.3.4	Thrombin induziert Histaminfreisetzung.....	53
<b>4.4</b>	<b>Thrombin führt nicht zu einer signifikanten Freisetzung von MCP-1..... bei Mastzellen.....</b>	<b>54</b>
<b>4.5</b>	<b>Eine Injektion von Thrombin in das murine Ohr löst eine sofortige Ohr- schwellung aus .....</b>	<b>55</b>
4.5.1	Thrombin führt dosisabhängig zu einer Hautentzündungsreaktion .....	55
4.5.2	Mastzellen kontrollieren die Thrombin-induzierte Hautentzündungsreaktion..	59



---

4.5.3	Thrombin führt <i>in vivo</i> zu einer Degranulation von Mastzellen .....	60
<b>4.6</b>	<b>Mastzell-Mediatoren verringern die Thrombinaktivität.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7</b>	<b>Die murine Mastzell-Protease 4 limitiert die Thrombin-induzierte Entzündung</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>101</b>

**0 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°	Grad
Abb	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
AMV-RT	<i>avian myoblastosis virus</i> -Reverse Transkriptase
AP	agonistisches Peptid(e)
AtP	antagonistisches Peptid(e)
β-Hex	beta-Hexosaminidase
BMCMC	Knochenmarks-generierte kultivierte Mastzelle(n) ( <i>bone marrow derived cultured mast cells</i> )
BMS 200261	PAR1 Antagonist
Bp	Basenpaare
C	Celsius
CD	Differenzierungsantigen ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
CPA	Carboxypeptidase
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> )
cGMP	zyklisches GMP
CTMC	Mastzelle(n) des Bindegewebstyps ( <i>connective tissue mast cell</i> )
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno Assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescent activated cell sorter</i> )
Fc <sub>γ</sub>	IgG Rezeptor
Fc <sub>ε</sub> RI	hochaffiner IgE Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
h	Stunde(n)
HDC	Histidindecaboxylase
HE	Hämalaun-Eosin

---

Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mab	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMC	Mastzelle(n) des Schleimhauttyps ( <i>mucosa type mast cells</i> )
mMCP	murine Mastzell-Protease(n)
MMLV-RT	<i>moloney murine leukemia virus</i> -Reverse Transkriptase
MMP	Matrixmetalloprotease
Mol	Maß für die Stoffmenge
mRNA	messenger RNA
MZ	Mastzelle(n)
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAR	Proteinase aktivierbare Rezeptor(en)
PAR-AP	PAR-agonistisches Peptid(e)
PAP-AtP	PAR-antagonistisches Peptid(e)
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCMC	Peritoneale kultivierte Mastzelle(n) ( <i>peritoneal cultured mast cells</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDG	Peptidoglykan
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

---

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCF	Stammzellfaktor ( <i>stem cell factor</i> )
SCH 79797	PAR1 Antagonist
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UN	Einheiten ( <i>units</i> )
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Mastzellen

#### 1.1.1 Charakterisierung und Differenzierung

Paul Ehrlich beschrieb 1877 erstmalig nach Färbung mit Anilin blau-violette Zellen, die unter anderem in der Darmschleimhaut lokalisiert waren, zahlreiche Granula enthielten und auch in der Nähe von Gefäßen akkumuliert auftraten<sup>1</sup>. Seine weiteren Untersuchungen zeigten: „dass das vermehrte Auftreten dieser Zellen sich nicht allein an die chronischen Entzündungen bindet, sondern überhaupt ein Attribut eines local gesteigerten Ernährungszustandes ist, der bald durch chronische Entzündungen, bald durch Stauung (braune Lungeninduration), bald durch Neubildungen (besonders Carcinome) hervorgerufen sein kann. Man kann von diesem Standpunkt aus die granulierten Zellen gewissermaassen als Producte der Mästung der Bindegewebszellen ansehen und sie dem entsprechend als Mastzellen bezeichnen.“<sup>2</sup>. Dieser ersten detaillierten Beschreibung der Mastzelle (MZ) folgten genauere Untersuchungen, die zeigten, dass die MZ innerhalb verschiedener Gewebe auch unterschiedliche Phänotypen aufweisen kann. 1966 lieferte Enerbäck den Beweis dafür, in dem er MZ spezifisch im Bindegewebe und in der intestinalen Mucosa von Ratten anfärbte<sup>3</sup>.<sup>4</sup>. Zurückgehend auf diese Untersuchungen werden MZ bis heute in zwei Typen eingeteilt, MZ der Schleimhaut (mucosa mast cells [MMC]) und MZ des Bindegewebes (connective tissue mast cells [CTMC]). Sie unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung, der Morphologie, in der Zusammensetzung der sekretorischen Granula sowie in der Größe. MMC weisen im Vergleich zu den CTMC weniger Granula auf und sind kleiner. Zusätzlich sind MMC durch einen geringeren Histamin- und Proteasengehalt in den Granula, kein oder wenig Serotonin und nur sehr geringe Mengen an Heparin gekennzeichnet<sup>5</sup>. Auch in ihrer Aktivierbarkeit sind diese zwei MZ-Populationen sehr verschieden. Beispielsweise degranulieren CTMC nach Stimulation mit dem Compound 48/80, MMC hingegen nicht<sup>6</sup>. Zusätzlich werden MMC und CTMC anhand ihrer gespeicherten Proteoglykane unterschieden. MMC enthalten Chondroitin E<sup>7,8</sup>, CTMC enthalten Heparin<sup>3</sup>. Die Färbung von MZ-Heparin mit Safraninrot ermöglicht eine Unterscheidung zwischen safraninrot negativen MMC und safraninrot positiven CTMC<sup>9,10</sup>. Ein weiterer Unterschied dieser beiden MZ-Typen besteht in der Expression von MZ-Proteasen (mMCP), namentlich Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase. So konnte im murinen System nachgewiesen werden, dass CTMC die MZ-Proteasen mMCP4, -5, -6 und -7 exprimieren, während MMC mMCP-1, -2, sowie -7 produzieren<sup>11</sup>.

MZ entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup> myeloiden Knochenmarksstammzellen<sup>12</sup>. Sie zirkulieren als Vorläuferzellen im Blut und differenzieren nach der Einwanderung in das Gewebe unter dem

Einfluss verschiedener Mediatoren entweder zu CTMC oder MMC<sup>13</sup>. Der wichtigste Wachstumsfaktor für MZ ist der von Stromazellen produzierte stem cell factor (SCF)<sup>14</sup>. Dieser kann sowohl als löslicher Mediator sezerniert oder als membrangebundener Faktor auf der Zelloberfläche exprimiert werden<sup>15</sup>. Kit (CD117), der Rezeptor für SCF, wird neben MZ unter anderem auch von hämatopoetischen Stammzellen, Vorläuferzellen und Melanozyten exprimiert. Der Kit / SCF Aktivierungsweg induziert bei MZ verschiedene Prozesse. So sind Kit / SCF Interaktionen entscheidend an der *in vivo* Differenzierung zu CTMC und MMC beteiligt<sup>16</sup>, ebenso an der Proliferation<sup>16</sup>, an der Mediatorfreisetzung<sup>17</sup> und auch an der Chemotaxis<sup>18</sup> von MZ. Zusätzlich ist die Expression des hochaffinen Fc $\epsilon$ -Rezeptors charakteristisch für MZ. Dieser bindet das Immunglobulin E (IgE)<sup>19</sup>, welches für die Erkennung und die Bindung von spezifischen Antigenen, z.B. eines Allergens, benötigt wird. Die anschließende Quervernetzung der IgE-Rezeptoren über das spezifische Antigen löst die Freisetzung von verschiedenen bioaktiven vorgeformt vorliegenden Mediatoren, wie beispielsweise Proteasen Histamin oder Heparin, sowie die Neusynthese unterschiedlicher Mediatoren aus. Damit spielen MZ eine entscheidende Rolle bei allergischen Reaktionen<sup>20</sup>.

### 1.1.2 Mastzellaktivierung und Mastzellprodukte

Die Aktivierung der MZ kann über verschiedene Rezeptoren erfolgen. Hierzu zählen neben dem hochaffinen IgE Rezeptor Fc $\epsilon$ RI<sup>19</sup> Toll-like-Rezeptoren (TLR)<sup>21</sup>, Komplementrezeptoren<sup>22</sup>, Zytokinrezeptoren<sup>23</sup> und Neuropeptidrezeptoren<sup>24</sup>. Ebenso ist eine Aktivierung über Proteasen möglich<sup>25</sup>.

Nach der Aktivierung können MZ eine Vielzahl verschiedener bioaktiver Mediatoren sezernieren (Tabelle 1), welche pro- oder antiinflammatorisch wirken können. MZ-Mediatoren werden in drei verschiedene Gruppen unterteilt: 1) vorgeformte und in Granula gespeicherte Produkte wie Proteasen, Histamin oder Tumornekrosefaktor (TNF); 2) nach Stimulation neusynthetisierte Mediatoren wie Zytokine und Chemokine; 3) Lipide wie Leukotriene oder Prostaglandine<sup>26,27</sup>.

Tabelle 1: Auswahl verschiedener MZ-Mediatoren, zusammengefasst in D. Metcalfe, Physiological Reviews, 1997<sup>26</sup>

Präformiert		de novo synthetisiert	Lipid-Mediatoren
<b>Histamin</b>		<b>Zytokine</b> IL-1, IL-2	<b>Leukotriene</b> LTB4
<b>Serotonin</b>		IL-3, IL-4	LTC4
<b>Proteasen</b>	Tryptasen	IL-5, IL-6	<b>Prostaglandin</b>
	Chymasen	IL-10	<b>Plättchen-aktivierender</b>
	Carboxypeptidase	<b>Chemokine</b> TNF	<b>Faktor</b>
<b>Proteoglykane</b>	Heparin	TGF-β	
	Chondroitin-	INF-γ	
	Sulfat	MCP1	
<b>TNF</b>		IL-8	

IL Interleukin; TGF-β Transforming growth factor beta; INF-γ interferone gamma; MCP-1 monocyte chemotactic protein 1; LTB4 Leukotrien B4; LTC4 Leukotrien C4;

In Abhängigkeit vom Aktivator können unterschiedliche Mediatoren sezerniert werden. Die klassische Aktivierung über das spezifische Antigen, welches an den IgE-Rezeptor bindet und anschließend eine Quervernetzung der IgE-Moleküle auslöst, führt sofort zu einer Degranulation der MZ. Das bedeutet, dass die vorgeformten Mediatoren wie Histamin und verschiedene Proteasen freigesetzt werden. Zusätzlich wird die Neusynthese verschiedener Zytokinen durch diese Quervernetzung angeschaltet<sup>28</sup>. Die Stimulation mit LPS löst hingegen die Produktion und Sezernierung von Zytokinen aus, nicht aber die Degranulation und die damit verbundene Freisetzung von präformiert vorliegenden Mediatoren<sup>29</sup>.

### 1.1.3 Physiologische und pathophysiologische Wirkung

MZ waren bisher vor allem aufgrund ihrer Rolle bei allergischen Reaktionen Gegenstand der medizinischen Forschung. Neuere Veröffentlichungen weisen jedoch auch auf eine Bedeutung von MZ bei der angeborenen und der adaptiven Immunantwort hin, wie beispielsweise bei der Abwehr von Bakterien (Abbildung (Abb.) 1).

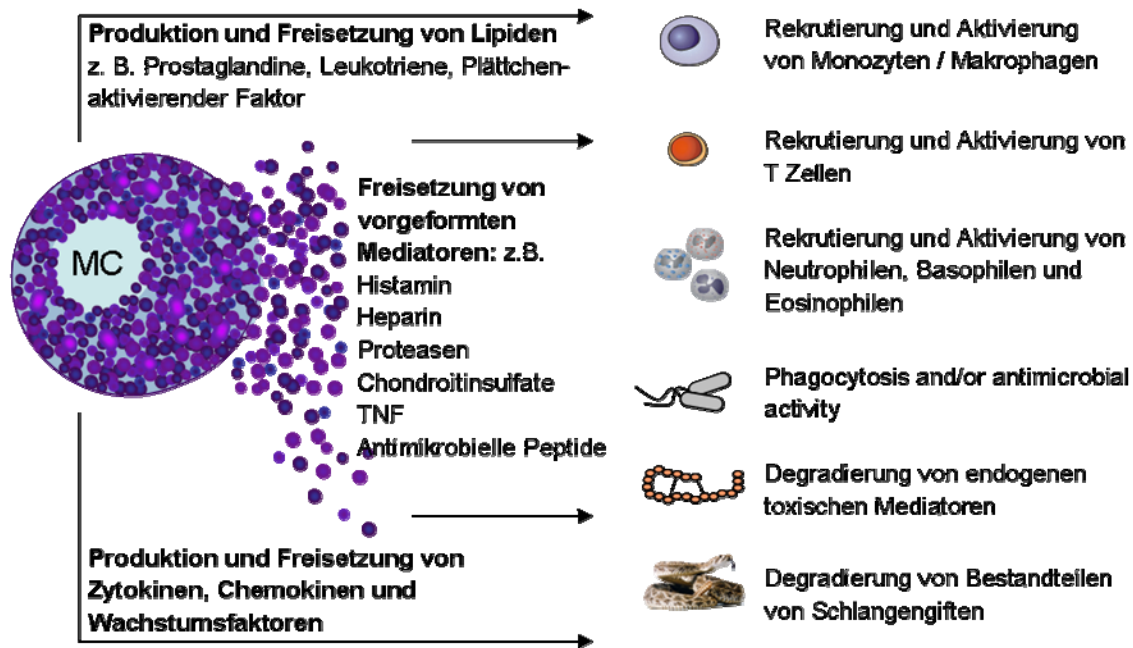


Abb. 1: Aktivierung von MZ führt zur sofortigen Freisetzung von vorgeformten MZ-Mediatoren und oder zur de novo Synthese von Mediatoren. Diese freigesetzten MZ-Mediatoren können verschiedene Effekte in unterschiedlichen Zellpopulationen auslösen. Zusätzlich sind sie bei der Abwehr von Pathogenen beteiligt und degradieren endogene sowie exogene Peptide. Modifiziert nach M. Metz und M. Maurer, Trends in Immunology, 2007<sup>30</sup>

MZ sind besonders zahlreich in der Haut (CTMC) sowie in den Schleimhäuten (MMC) des Gastrointestinaltraktes und des Bronchialtraktes lokalisiert, also in Organen, die als eine erste Barriere Schutz vor der Umwelt bieten<sup>31</sup>. Sowohl durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose als auch durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und Rekrutierung von Lymphozyten und Granulozyten<sup>32-34</sup> sind MZ in der Lage, Entzündungsreaktion<sup>35-37</sup> auszulösen. Darüber hinaus wird ihnen eine Bedeutung bei der Wundheilung und Geweberegeneration<sup>38,39</sup> sowie bei der Angiogenese<sup>40, 41</sup> zugeschrieben. Durch die Freisetzung verschiedener Proteasen sind sie zusätzlich in der Lage, Entzündungsprozesse direkt durch die Degradierung von Peptiden zu beeinflussen<sup>42</sup> sowie verschiedene Gifte zu detoxifizieren<sup>43</sup>.

MZ können bei der Abwehr von Pathogenen über verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Die Expression verschiedener TLR erlaubt die Detektion von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Die Detektion von Peptidoglycan (PDG), einem Zellwandbestandteil von grampositiven Bakterien wie beispielweise *Staphylococcus aureus*, erfolgt über TLR2. Die Expression von TLR-4 ermöglicht eine Detektion des Lipopolysaccharids (LPS), eines Zellwandbestandteils gramnegativer Bakterien, wie *Escherichia coli*. Die Stimulation mit PDG oder LPS löst die Sezernierung von TNF, IL-5, IL-10 und IL-13, Zytokinen die eine Th2-Antwort nach sich ziehen, aus. Zusätzlich induziert die Aktivierung über PDG auch die Freisetzung von Histamin, LPS hingegen nicht. Um auf LPS zu reagieren benötigt die MZ ein weiteres Signal, die Anwesenheit von löslichem CD14<sup>44</sup>. Der Komplex aus TLR-4, LPS und CD14 löst die Aktivierung und die anschließende



Signaltransduktion aus. Die Expression von CD48 auf der MZ ermöglicht die Detektion von Fimbrien-tragenden Bakterien. Nach Erkennung der Bakterien sezerniert die MZ TNF<sup>45</sup>, welches die Rekrutierung von Neutrophilen auslöst<sup>46</sup>.

MZ können auch über Produkte, die als Folge bakterieller Infektionen entstehen, aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung der Komplementfaktoren C3a und C5a an deren Rezeptoren auf MZ<sup>47</sup>. In einem Modell einer experimentellinduzierten Sepsis wiesen C3-defiziente Mäuse eine deutlich höhere Mortalität auf als die korrespondierenden WT-Mäuse. Die hohe Mortalität war auf geringe Degranulation der PMC, Erniedrigung der TNF Level, Verminderung der Neutrophilenrekrutierung und Verringerung der bakteriellen Clearance zurückzuführen<sup>22</sup>. Nach Zugabe von aufgereinigtem C3 erfolgte auch in C3-defizienten Tieren die Prozessierung von C3 zu C3a und C3b und eine Normalisierung der MZ-abhängigen antibakteriellen Antworten<sup>22</sup>. Diese Erkenntnisse erweitern frühere Ergebnisse von Echtenacher und Kollegen, die erstmals im gleichen murinen Modell der Sepsis zeigen konnten, dass MZ protektiv wirken können<sup>48</sup>. MZ-defiziente Mäuse wiesen hier nach Induktion einer Sepsis eine deutlich erhöhte Mortalität im Vergleich zu den WT-Mäusen auf. Da MZ nach Aktivierung sofort TNF freisetzen können und TNF die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen unterstützt, die eine septische Entzündung entscheidend beeinflussen, erfolgte eine Blockade des TNF durch Zugabe von spezifische Antikörper. Die protektive Wirkung der MZ wurde dadurch aufgehoben<sup>48</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das freigesetzte TNF als Chemoattraktant auf Neutrophile wirkt, diese zum Ort der bakteriellen Entzündung lockt und somit die Abtötung der Bakterien begünstigt<sup>46</sup>.

Durch die bevorzugte Lokalisierung von MZ in der Haut<sup>31</sup> sowie um Blutgefäße<sup>49</sup> sind sie prädestiniert für eine Beteiligung an der Wundheilung. Diese vollzieht sich in verschiedenen Schritten: einer initialen Entzündungsreaktion, einer anschließenden Proliferationsphase, gefolgt von einem Umbau der extrazellulären Matrix. Weller und Kollegen konnten 2006 zeigen, dass MZ in den ersten Stunden der Wundheilung notwendig sind, um eine normale Regenerierung der Haut nach einer Verletzung zu erreichen. MZ-defiziente Mäuse zeigten eine schlechtere Wundheilung im Vergleich zu MZ-kompetenten Mäusen, welche eine deutliche Degranulation von MZ um den Wundrand herum aufwiesen. Zusätzlich wiesen MZ-kompetente Mäuse eine erhöhte Gefäßpermeabilität im Vergleich zu MZ-defizienten Mäusen auf. Der Einstrom von Neutrophilen war in MZ-defizienten Mäusen deutlich geringer<sup>50</sup>. Ein Prozess, der während der Wundheilung von Bedeutung ist, die Angiogenese, wird ebenso von MZ beeinflusst<sup>41, 51</sup>. Das von MZ nach Degranulation freigesetzte Histamin nimmt über die Histaminrezeptoren 1 und 2 Einfluss auf die Angiogenese<sup>52</sup>. Eine Blockade der Histaminrezeptoren durch spezifische Antagonisten führte zu einer Verringerung der Anzahl der Gefäße pro untersuchter Fläche sowie zur Verringerung der Gefäßdichte<sup>52</sup>. Diese Untersuchungen stützen sich auf die Ergebnisse von Jakobsson, der 1994 zeigen konnte,

dass nach Stimulation mit dem Compound 48/80 freigesetzte MZ-Mediatoren eine Vergrößerung der Gefäßoberfläche, des luminalen Gefäßdurchmessers und der vaskularisierten Fläche - sozusagen eine Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes - induzieren<sup>53</sup>. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung der MZ-Tryptase zu einer Neovaskularisierung führt<sup>40</sup>. Unterstützt wird die Neubildung von Gefäßen auch durch die Sezernierung des *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) nach MZ-Aktivierung<sup>54</sup>. Eine Interaktion von Endothelzellen und der bei der Aktivierung von MZ freigesetzten Tryptase führt zu einer erhöhten Freisetzung von IL-8<sup>55</sup>, ein Chemokin, welches bei der Rekrutierung von Leukozyten benötigt wird. MZ können IL-8 ebenfalls sezernieren und somit beispielsweise T-Zellen an den Ort einer bakteriellen Infektion locken<sup>56</sup>. Eine Interaktion von MZ und T-Zellen ist möglich, da MZ den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex II* [MHC II]), das *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und das *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) exprimieren<sup>57</sup>. Die Integrine ICAM-1 und LFA-1 sind wichtig bei Zell-Zell-Interaktionen, und sie sind an der Kommunikation unter den Zellen beteiligt. Die Interaktion von MZ mit T-Zellen in Anwesenheit eines spezifischen Antigens resultiert in der Proliferation der T-Zellen<sup>57</sup>. MZ werden über die Interaktion von ICAM-1 und LFA-1 zur Freisetzung von Histamin angeregt<sup>58</sup>. Darüber hinaus können MZ T-Zellen aktivieren, indem sie bakterielle Bestandteile prozessieren und ihnen diese über den MHC I präsentieren<sup>59</sup>. Zusätzlich exprimieren MZ auch kostimulatorische Moleküle<sup>60</sup>.

#### 1.1.4 Primäre murine *in vitro* Mastzellmodelle

*In vitro* können murine MZ in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden. Hierfür werden MZ entweder aus Vorläuferzellen, beispielsweise dem Knochenmark<sup>61</sup>, generiert oder aus Geweben, beispielsweise aus dem Peritoneum oder der Haut, isoliert. Dabei stellen die aus dem Knochenmark generierten MZ (*bone marrow derived cultured mast cells* [BMCMC]) die am geringsten differenzierten MZ dar und entsprechen in vielen Aspekten den MMCs *in vivo*. Aus dem Peritoneum gewonnene MZ (*peritoneal mast cells* [PMC])<sup>62</sup> oder aus dem Peritoneum gewonnene kultivierte MZ (*peritoneal cultured mast cells* [PCMC])<sup>63</sup> weisen einen deutlich höheren Grad der Differenzierung auf als BMCMC und entsprechen weitgehend den CTMC, ebenso aus der Haut isolierte MZ<sup>64</sup>.

Für die Kultivierung von murinen MZ *in vitro* sind 2 Zytokine essentiell, SCF und IL-3. IL-3 ist entscheidend für die Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu BMCMC<sup>65</sup>. SCF ist unerlässlich für die Differenzierung und Proliferation der MZ *in vitro*<sup>66</sup>. Wie unter 1.1.1 dargestellt, weisen MZ eine Heterogenität und Unterschiede in der Zusammensetzung der Granula zwischen den einzelnen *in vitro* kultivierten MZ-Populationen auf. Die Supplementierung der BMCMC-Kultur mit IL-3 resultiert in einem Phänotyp verschieden zu BMCMC, kultiviert in Anwesenheit von SCF und IL-3<sup>67</sup>.

Beschrieben ist ebenso eine phänotypische Veränderung der BMCMC, wenn sie mit Fibroblasten kokultiviert werden<sup>9</sup>. Eine Verunreinigung der Primärkultur mit Fibroblasten kann so zu einer Änderung des Phänotyps der MZ führen.

### 1.1.5 Mausmodelle

#### 1.1.5.1 MZ-defiziente Mäuse

Besonders geeignet für die Untersuchung der MZ-Biologie *in vivo* sind die genetisch MZ-defizienten Mausstämme WBB6F1 *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* und C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*. Treten bei der Analyse Unterschiede zwischen MZ-defizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtyp (WT)-Mäusen auf, sprechen diese für die Beteiligung einer oder mehrerer Kit-positiver Zellpopulationen an der Auslösung der untersuchten Reaktion.

Aufgrund zwei verschiedener spontan auftretender Punktmutationen in *kit* exprimieren die WBB6F1 *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* Mäuse den für die Entwicklung der MZ essentiellen Kit-Rezeptor nur in einer stark funktionell eingeschränkten Form und weisen dadurch eine MZ-Defizienz auf<sup>68-70</sup>. Da der Kit-Rezeptor auch für die Entwicklung von Melanozyten essentiell ist, weisen WBB6F1 *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* Mäuse neben der Abwesenheit von MZ auch eine Melanozytendefizienz auf und sind durch eine weiße Fellfärbung gekennzeichnet<sup>71</sup>. Sie sind außerdem anämisch und steril<sup>72</sup>.

Die ebenfalls genetisch MZ-defiziente C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Maus weist eine spontane Inversionsmutation auf, die das regulatorische Element oberhalb des *kit* betrifft<sup>73</sup>. Dies führt zu einer fehlenden Expression des Kit-Rezeptors in MZ. Die Melanozyten der C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Maus sind ebenfalls betroffen. Dies resultiert wie bei den WBB6F1 *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* Mäusen in einer weißen Fellfärbung<sup>74</sup>. Ein Vorteil der experimentellen Nutzung von C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen gegenüber den WBB6F1 *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* Mäusen ist, dass sie fertil und nicht anämisch sind. Zusätzlich entspricht der genetische Hintergrund der C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Maus den C57BL/6 Mäusen, welche ein Standardmodell in der tierexperimentellen Arbeit darstellen.

Entgegen den Untersuchungen von Grimaldeston und Kollegen, die zeigten, dass die C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäuse keinen Defekt in immunologisch relevanten Zellpopulationen wie Basophilen, dendritischen Zellen, Neutrophilen, Natürlichen Killerzellen und B- und T-Lymphozyten aufweisen<sup>75</sup>, zeigten neueste Untersuchungen von Nigrovic und Kollegen, dass C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäuse eine Splenomegalie einhergehend mit einer erhöhten Anzahl von myeloiden und megakaryozytären Zellen entwickeln. Die hemapoetischen Veränderungen führen zu einer Neutrophilie und Thrombozytose<sup>76</sup>.

### 1.1.5.2 Spezifischer „knock out“ von MZ-Proteasen

Wegen der unter 1.1.5.1 dargestellten Defizite der MZ-defizienten Mäuse wurden in den letzten Jahren Mausmodelle entwickelt, in denen einzelne MZ-Proteasen spezifisch ausgeschaltet sind. Zudem weisen diese Modelle gegenüber einer möglichen pharmakologischen Depletierung der MZ-Proteasen eine hohe Spezifität auf, da der „knock out“ nur ein Gen betrifft. Mögliche unerwünschte Wirkungen des Pharmakons müssen in einem „knock out“-Modell nicht berücksichtigt werden. Für die Untersuchung einzelner MZ-Proteasen stehen unter anderem folgende „knock out“-Modelle zur Verfügung: *mMCP1*<sup>-/-77</sup>, *mMCP4*<sup>-/-78</sup>, *mMCP5*<sup>-/-79</sup>, *MC-CPA*<sup>-/-80</sup>. Diese genetisch veränderten Mäuse ermöglichen eine genauere Charakterisierung von MZ-abhängigen Prozessen, da die fehlenden Proteasen von entscheidender Bedeutung während des Entzündungsprozesses, des Gewebeumbaus und der Zellrekrutierung sind<sup>55,81, 82</sup>. 2005 wiesen Tchougounova und Kollegen nach, dass die MZ-Protease mMCP4 für die Spaltung der pro-Form der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 benötigt wird. In Geweben der mMCP4-defizienten Mäuse wurde nur proMMP-9 nachgewiesen, wohingegen im WT sowohl proMMP-9 als auch MMP-9 detektiert wurden. MMP-2 wurde in mMCP4-defizienten Mäusen nur sehr schwach prozessiert. Die histologische Untersuchung von Lungen- und Ohrgewebe zeigte im Vergleich zum WT eine deutlich stärkere Färbung für Fibronectin<sup>83</sup>.

### 1.1.5.3 Wiederherstellung der MZ-Population

Um zu prüfen, ob solide Unterschiede innerhalb des Entzündungsgeschehens auf das Fehlen von MZ zurückzuführen sind und nicht auf anderen Kit-abhängigen Defekten beruhen, kann die MZ-Defizienz durch den adoptiven Transfer von MZ, beispielsweise durch die Injektion von Knochenmarkszellen<sup>75</sup> oder BMCMC<sup>84</sup> „repariert“ werden. Schon 1977 konnten Kitamura und Kollegen zeigen, dass der intravenös durchgeführte semisyngene Transfer von Knochenmark aus C57BL *Bg*<sup>1</sup>/*Bg*<sup>1</sup> Mäusen (gekennzeichnet durch abnormal große MZ<sup>85</sup>) in bestrahlte C57BL Mäuse eine Einwanderung von Donor-Knochenmarkszellen und Ausreifung dieser Zellen zu CTMC in der Haut und MMC in den Schleimhäuten des Magen-Darm-Trakts der Rezipienten hervorruft<sup>86</sup>. Der adoptive Transfer von WT BMCMC in MZ-defiziente WBB6F1 *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> Mäuse führt zur Anwesenheit von MMC und CTMC in den entsprechenden Geweben<sup>87</sup>. Diese „knock in“-Strategie ermöglicht eine genaue Untersuchung von MZ-abhängigen Prozessen. Die Rekonstitution der MZ-defizienten Mäuse kann sowohl lokal<sup>88,89</sup> als auch systemisch (intravenös)<sup>90</sup> erfolgen. Für eine erfolgreiche Rekonstitution und eine korrekte Analyse der Ergebnisse muss beachtet werden, welches das zu rekonstituierende Zielorgan ist. Der systemischen Rekonstitution mit BMCMCs folgt nicht automatisch in jedem Organ eine erfolgreiche Wiederherstellung der MZ-Population. Die MZ-Population in der Haut wird nach systemischer BMCMC-Applikation beispielsweise

nur zu einem Drittel wiederhergestellt, wohingegen die Milz eine komplette Rekonstitution aufweist<sup>87</sup>. Um die MZ-Population in der Haut auf einem physiologischen Niveau wiederherzustellen, muss eine Rekonstitution der Haut lokal erfolgen. Das MZ-Rekonstitutionsmodell bietet die Möglichkeit, MZ-defiziente Mäuse mit MZ genetisch veränderter Mäuse zu rekonstituieren<sup>37</sup>. Dies kann Aufschluss über die Beteiligung von verschiedenen MZ-Mediatoren oder -Rezeptoren innerhalb des zu untersuchenden Prozesses geben.

## **1.2 Die Serinprotease Thrombin**

### **1.2.1 Generierung, Funktion und Hemmung von Thrombin im Rahmen der Gerinnungskaskade**

Thrombin (Faktor IIa) ist eine Serinprotease, die eine Schlüsselposition innerhalb der Gerinnungskaskade einnimmt. Es wird enzymatisch aus Prothrombin (Faktor II) mit Hilfe des Prothrombinasekomplexes, bestehend aus Faktor Xa, Faktor Va, Kalzium und Phospholipiden, freigesetzt<sup>91</sup>. Prothrombin wird ausschließlich in der Leber gebildet und zirkuliert im Blut. Die Freisetzung von Thrombin erfolgt in jeder Traumasituation, die in einer Schädigung der Gefäßwand und somit einer Aktivierung des Endothels und der Thrombozyten resultiert. Diese Schädigung kann sowohl mechanisch, chemisch als auch elektrisch erfolgen<sup>92</sup>. Thrombin katalysiert anschließend die Proteolyse von löslichem Fibrin zu unlöslichen Fibrinogenmonomeren<sup>93</sup> sowie die Aggregation der Thrombozyten, was die Ausbildung eines Blutgerinnsels (Thrombus) zur Folge hat<sup>94</sup>.

Die Hemmung von Thrombin erfolgt über dessen Bindung an natürliche Inhibitoren wie Antithrombin III<sup>95</sup>,  $\alpha$ 2-Macroglobulin<sup>96</sup>, Heparin-Kofaktor II<sup>97</sup> oder auch  $\alpha$ 1-Antitrypsin<sup>98</sup>. Die Komplexierung mit Antithrombin führt zur Hemmung des katalytischen Zentrums von Thrombin<sup>95</sup>. Zusätzlich kann eine Hemmung der Gerinnungskaskade dadurch erreicht werden, dass Thrombin an Thrombomodulin, ein Membranprotein von Endothelzellen, bindet<sup>99</sup>. Durch diese „Entfernung“ des Thrombins aus dem Blut wird die Gerinnungsreaktion gestoppt.

### **1.2.2 Zelluläre Funktionen der Serinprotease Thrombin durch die Interaktion mit Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren**

Zusätzlich zu der Funktion innerhalb der Gerinnungskaskade ist Thrombin ein natürlicher Aktivator der Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren (PAR) 1, 3 und 4. Die ubiquitäre Expression von PAR1 im Organismus<sup>100-103</sup> und der Nachweis zweier weiterer Thrombinrezeptoren PAR3<sup>104, 105</sup> und PAR4<sup>106</sup>, legt nahe, dass Thrombin in der Lage ist,

verschiedene zelluläre Reaktionen auszulösen. In der Tat werden durch das Schneiden von PAR1, 3 oder 4 durch Thrombin und die anschließende Aktivierung der Zelle je nach Zelltyp verschiedene Prozesse in Abhängigkeit vom Expressionsmuster der PAR ausgelöst.

Die Expression von PAR in mehreren verschiedenen Zellpopulationen, die in der Haut vorkommen, wie MZ<sup>107</sup>, Keratinozyten<sup>108</sup>, Fibroblasten<sup>109</sup> oder auch Neuronen<sup>110</sup> und Endothelzellen<sup>100</sup> spricht für eine PAR-vermittelte Rolle von der Serinprotease Thrombin bei kutanen Prozessen.

**Mastzellen.** Schon 1984 konnten Razin und Kollegen zeigen, dass BMCMCs nach Stimulation mit Thrombin degranulieren<sup>25</sup>. Der Nachweis der Expression von PAR 1 und PAR2 auf humanen MZ und somit die Möglichkeit der MZ, direkt auf Thrombin zu reagieren, wurde 2000 von D'Andrea und Kollegen erbracht<sup>107</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen, dass primäre humane Haut-MZ alle derzeit bekannten PAR exprimieren<sup>111</sup>. Die Stimulation einer MZ-Zelllinie, C1.MC/C57, mit Thrombin resultierte in einer erhöhten Freisetzung von IL-6, die jedoch nicht mit einer erhöhten Freisetzung an TNF einherging<sup>112</sup>. Die MZ kann also nach Thrombinaktivierung sowohl mit einer Degranulation als auch mit einer Sezernierung von Zytokinen reagieren.

**Keratinozyten.** Sowohl die Expression von PAR1 als auch von PAR2 ist für Keratinozyten beschrieben. Jedoch führte die Aktivierung über PAR2 zu einer stärkeren Kalziummobilisation im Vergleich zu einer Stimulation mit Thrombin<sup>108</sup>.

**Fibroblasten.** Die Stimulation mit Thrombin führte bei Fibroblasten zu einer Veränderung der Morphologie und einer verstärkten Adhäsion<sup>113</sup>. Eine Thrombinstimulation führte zu einer erhöhten Proliferation sowie Kalziumfreisetzung in Fibroblasten. Diese Interaktion könnte auf eine Beteiligung von Thrombin bei der Ausbildung einer Fibrose hinweisen<sup>109</sup>. Arbeiten von Deng und Kollegen weisen eine Freisetzung von MCP-1 nach Thrombinstimulation von Fibroblasten nach<sup>114</sup>, was in einer Rekrutierung von Leukozyten resultieren und dadurch die Bekämpfung einer Entzündung unterstützen kann.

**Nervenzellen.** Die Inkubation von Neuroblastomzellen mit Thrombin kann den Ergebnissen von Arbeiten von Cunningham und Gurwitz zufolge in einer Generierung von cGMP<sup>115</sup>, einem second messenger, sowie in der Neuritenbildung resultieren<sup>116</sup>. Die Stimulation von kultivierten Nervenzellen mit Thrombin führte zu einem erhöhten Einstrom von Kalzium<sup>117</sup> und somit zu einer Aktivierung der Zelle.

**Endothelzellen.** Nach Berichten von Mailik und Fenton kann eine Stimulation von Endothelzellen mit Thrombin die Expression von ICAM-1 sowie P-Selektin auslösen, was in einer Rekrutierung von Neutrophilen resultiert<sup>118</sup>. Zusätzlich führte die Stimulation mit Thrombin zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität, was die Rekrutierung von Leukozyten begünstigt<sup>119</sup>. Arbeiten von Colotta und Kollegen zeigen, dass der Einstrom von Leukozyten durch die Freisetzung des auf Monozyten chemotaktisch wirkende MCP-1

unterstützt wird, welches von Endothelzellen nach Stimulation mit Thrombin sezerniert wird<sup>120</sup>. Außerdem kann Thrombin auch auf die Angiogenese Einfluss nehmen. Das Schneiden des PAR1 auf Endothelzellen durch Thrombin löste eine Sezernierung verschiedener angiogener Mediatoren, wie beispielsweise MMP-9 und VEGF-C, aus und bewirkte dadurch die Bildung neuer Gefäße<sup>121</sup>.

### 1.3 Proteinase aktivierbare Rezeptoren

#### 1.3.1 Einführung

Proteinase aktivierbare Rezeptoren (PAR) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. Der bis heute am besten charakterisierte Rezeptor ist der Thrombinrezeptor PAR1<sup>100</sup>. Bis heute sind vier verschiedene PAR (PAR1-4) bekannt, die ubiquitär im Organismus vorkommen: PAR1<sup>100, 122</sup>, PAR2<sup>123, 124</sup>, PAR3<sup>104, 105</sup> und PAR4<sup>106</sup>. Für MZ, Endothelzellen, T-Zellen, Monozyten, Neutrophile sowie Neuronen wurde die Expression von PAR1 und PAR2 beschrieben. PAR1, 3 und 4 werden auf Thrombozyten exprimiert. Zusätzlich wurden folgende Gewebe als positiv für PAR3 und PAR4 beschrieben: Gehirn, Leber, Pankreas. PAR3 wird auch von MZ, Monozyten und Makrophagen exprimiert, PAR4 von MZ, Kupfer-Zellen und Nerven. PAR3 ist allerdings im murinen System als Kofaktor von PAR4 beschrieben<sup>125</sup>. PAR sind unter anderem an der Blutgerinnung, der Fibrinolyse sowie an der Modulation von Entzündungsprozessen beteiligt<sup>103, 126, 127</sup>.

#### 1.3.2 Aktivierung und Abbau

Die Aktivierung der PAR erfolgt durch das Schneiden der Rezeptoren durch Serinproteasen. Diese Proteasen liegen als Zymogene vor und werden proteolytisch aktiviert. Charakteristisch für Serinproteasen ist die aktive Aminosäure Serin, welche zusammen mit den Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure die katalytische Triade im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne bildet. Diese katalytische Domäne sorgt für die chemische Selektivität der Serinproteasen und ermöglicht die Hydrolyse von Peptidbindungen auf der Carboxyseite von Aminosäuren<sup>128-130</sup>. PAR1, 3 und 4 können unter anderem von den Serinproteasen Thrombin, Trypsin und Kathepsin G aktiviert werden<sup>100, 104-106, 123, 124</sup>. PAR2 hingegen ist Thrombin-resistent und kann unter anderem durch MZ-Tryptase und Faktor Xa aktiviert werden<sup>129,131</sup>. Die Serinprotease Thrombin schneidet PAR1 spezifisch zwischen Arginin und Serin<sup>100, 122</sup>. Die Aktivierung der PAR durch Serinproteasen erfolgt proteolytisch (siehe Abb. 2) am N-terminalen Ende des Rezeptors. Hierdurch legen sie eine Signalsequenz frei, den so genannten „tethered ligand“ (Übersicht siehe Tabelle 2)<sup>100, 124</sup>.

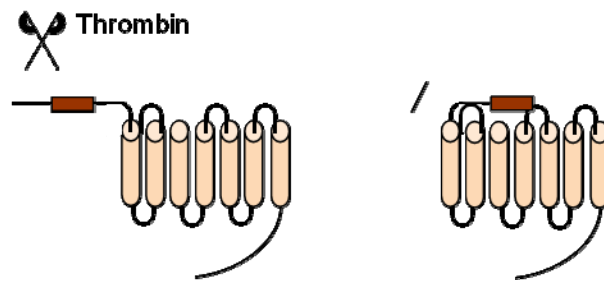


Abb. 2: Schematische Darstellung der PAR-Aktivierung durch Serinproteasen am Beispiel von Thrombin. A) Die Serinprotease Thrombin schneidet den PAR an der spezifischen Schnittstelle, die Signalsequenz wird freigelegt (brauner Kasten A). B) Die anschließende Konformationsänderung ermöglicht die Bindung an extrazelluläre Rezeptoranteile und löst dadurch die Signaltransduktion aus. Modifiziert nach O. Déry, American Journal of Physiology, 1998<sup>132</sup>.

Durch die anschließende Konformationsänderung bindet diese Sequenz, bestehend aus 6 Aminosäuren, an extrazelluläre Anteile des Rezeptors und löst dessen Aktivierung und die nachfolgende Signaltransduktion aus<sup>132</sup>. Im Unterschied zur bekannten Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über lösliche Faktoren durch Ausbildung einer reversiblen Bindung zwischen Rezeptor und Ligand ist die Bindung des proteolytisch freigesetzten „tethered ligand“ an den PAR irreversibel<sup>133</sup>. Die folgende Internalisierung des Rezeptors sowie der lysosomale Abtransport des Rezeptors terminieren den Aktivierungsprozess<sup>134</sup>. PAR Rezeptoren können auch durch ein Schneiden von Proteasen außerhalb der Signalsequenz inaktiviert werden. Diese Inaktivierung kann beispielsweise durch die von Neutrophilen sezernierte Protease Kathepsin G ausgelöst werden<sup>135,136</sup>.

Eine Besonderheit bei der Aktivierung weist PAR4 auf. Im murinen System fungiert PAR3 als Kofaktor von PAR4. Durch die räumliche Nähe von PAR3 zu PAR4 auf der Zelloberfläche kommt es zu einer Heterodimerisierung. PAR3 wird von Thrombin geschnitten, Thrombin bleibt an PAR3 gebunden und ist anschließend in der Lage PAR4 zu schneiden, dadurch zu aktivieren und die nachfolgende Signaltransduktion auszulösen<sup>125</sup>.

Tabelle 2: Übersicht über die „tethered ligand“ Sequenz für humane und murine PAR. Modifiziert nach M.D. Hollenberg & S.J. Compton, Pharmacological Reviews, 2002<sup>137</sup>

Rezeptor	Signalsequenz human	Signalsequenz murin
<b>PAR1</b>	SFLLR	SFFLR
<b>PAR2</b>	SLIGKV	SLIGRL
<b>PAR3</b>	TFRGAP	SFNGGP
<b>PAR4</b>	GYPGQV	GYPGKV



### 1.3.3 Physiologische und pathophysiologische Wirkungen

Im Verlauf einer Entzündung können Serinproteasen innerhalb der Gerinnungskaskade oder von inflammatorischen Zellen, beispielsweise von MZ, oder vom Epithelgewebe freigesetzt werden. Diese Proteasen können nachfolgend den entsprechenden PAR auf verschiedenen Zelltypen spezifisch aktivieren und so Einfluss auf den Entzündungsprozess und die Immunantwort nehmen. Dabei ist die ausgelöste Antwort abhängig von der Zelle, die stimuliert bzw. aktiviert wird<sup>103, 127</sup>.

#### 1.3.3.1 Proteinase aktivierbarer Rezeptor 1

Viele Ergebnisse bezüglich des PAR1 wurden aufgrund seiner Spezifität für die Serinprotease Thrombin gewonnen. Die Expression von PAR1 ist für verschiedene Zellen des Immunsystems beschrieben<sup>101</sup>. In einem Modell der Antigen-induzierten Arthritis war eine deutliche Verringerung der Gelenkschwellung in PAR1 defizienten Mäusen nachweisbar. Histologische Untersuchungen zeigten eine Verringerung der Knochen- und Knorpelschädigung sowie eine verringerte Expression der Zytokine IL-1 und IL-6 und der Matrixmetalloprotease 13<sup>138</sup>. Des Weiteren konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass die Aktivierung des PAR1 zu einer Analgesie führt, die auf der Aktivierung des Opioidrezeptors beruht<sup>139</sup>.

Die Aktivierung von PAR1 auf primären afferenten Neuronen führt zur Sezernierung der Substanz P. Diese wiederum aktiviert Endothelzellen insofern es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität sowie zur Ausbildung eines Ödems kommt<sup>117</sup>.

#### 1.3.3.2 Proteinase aktivierbarer Rezeptor 2

Der einzige Thrombin-resistente PAR, PAR2, wird auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert. Beschrieben ist die Expression beispielsweise für MZ, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Nervenzellen<sup>127</sup>.

2005 konnten He und Kollegen *in vitro* zeigen, dass aus Tonsillen isolierte MZ durch eine Stimulation von PAR2 degranulieren und Tryptase freisetzen, Haut-MZ setzen nach Stimulation von PAR2 Histamin frei. Die Stimulation mit Trypsin resultiert in der Freisetzung von Histamin aus Haut-MZ und MZ aus den Tonsillen<sup>140</sup>.

Die Stimulation von PAR2 auf Neutrophilen löste eine erhöhte Expression von CD11b aus. Gleichzeitig wurde ein Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Trypsinstimulation beobachtet<sup>141</sup>. *In vitro* wurde gezeigt, dass eine Stimulation des PAR2 zu einer erhöhten Expression des *membrane-activated complex-1* (Mac-1) sowie des *very late antigen 4 integrine* (VLA) in Neutrophilen führt. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Chemotaxis dieser Zellen ausgelöst. Eine vermehrte Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-8 und IL-6 durch Neutrophile wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Expression des L-Selektin wurde herunterreguliert<sup>141</sup>.

Diese Ergebnisse zeigen, dass PAR2 auf Neutrophilen entscheidend an der Migration und der Bekämpfung einer Entzündung bzw. Infektion beteiligt ist<sup>141</sup>.

In der Haut exprimieren neben MZ vor allem Keratinozyten und Epithelzellen PAR2. Eine Stimulation mit Trypsin sowie mit MZ-Tryptase führen zu einem erhöhten Einstrom von Kalzium. In entzündeten Hautarealen war ein deutlicher Anstieg der PAR2 Expression nachweisbar<sup>142</sup>. Dies deutet darauf hin, dass PAR2 auf Keratinozyten oder Epithelzellen in einem entzündlichen Geschehen, wie zum Beispiel bei der atopischen Dermatitis, durch MZ-Tryptase aktiviert werden könnte<sup>142</sup>. 2003 konnten Seeliger und Kollegen belegen, dass PAR2 in einem Modell einer entzündlichen Hauterkrankung von entscheidender Bedeutung ist. Die Leukozytenadhäsion über die Expression von E-Selektin und ICAM-1 sowie die Extravasation war in PAR2 defizienten Mäusen deutlich erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen<sup>143</sup>.

#### **1.3.3.3 Proteinase aktivierbarer Rezeptor 3**

Viele Untersuchungen von PAR3 erfolgten an Thrombozyten. Die Blockierung von PAR3 auf murinen Plättchen führte zu einer verringerten Kalziummobilisierung, ATP-Freisetzung sowie Plättchenaggregation<sup>144</sup>. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen Untersuchungen an PAR3-defizienten Mäuse die zeigten, dass die Abwesenheit von PAR3 zum Schutz bei experimentell-induzierten Thrombosen führt<sup>145</sup>. Es wurde festgestellt, dass im murinen System PAR3 über Thrombin keine Signalkaskade auslöst, auch dann nicht wenn PAR3 überexprimiert wird<sup>96</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass PAR3 im murinen System als Kofaktor für PAR4 fungiert<sup>125</sup>.

#### **1.3.3.4 Proteinase aktivierbarer Rezeptor 4**

Ebenso wie PAR3 wurden auch zu PAR4 die meisten Untersuchungen an Blutplättchen durchgeführt, die im murinen System neben PAR3 auch PAR4 exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass PAR4 die Aggregation dieser Zellen vermittelt<sup>146</sup>. Die Stimulation von sensorischen Neuronen, die PAR4 exprimieren, löste einen intrazellulären Kalziumstrom aus und führte zur Aktivierung des Vanilloid-Rezeptors 1, einem Rezeptor, der für die Auslösung von Schmerzen durch sensorische Neuronen entscheidend ist<sup>147</sup>. Somit könnten PAR auch bei der Reizweiterleitung innerhalb eines entzündlichen Geschehens von Bedeutung sein<sup>148</sup>. In einem Modell des Aortenverschlusses wiesen PAR4-defiziente Mäuse eine deutlich geringere Schädigung durch Ischämie-Reperfusion auf. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Adhäsion der Blutplättchen und der Leukozyten sowie der Defekt der Blut-Hirn-Schranke vermindert ist<sup>149</sup>. Weitere Untersuchungen zu PAR4 zeigten, dass die Expression von ICAM-1 und Selektinen und das damit verbundene Rollen der Leukozyten an Gefäßwänden auf die Expression von PAR4 zurückzuführen ist und nicht ausschließlich über PAR1 vermittelt wird<sup>150</sup>.

### 1.3.4 Synthetische Agonisten und Antagonisten der Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren

#### 1.3.4.1 Agonisten

Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Aktivatoren der PAR, den Serinproteasen, wurden im Zuge der Erforschung dieser Rezeptorfamilie agonistische Peptide (AP) entwickelt, die der Aminosäuresequenz der nach Aktivierung freigelegten „tethered ligand“ Sequenz entsprechen bzw. von ihr abgeleitet sind (siehe Tabelle unter 1.2.2). Dadurch ist eine selektive Aktivierung der PAR möglich, unabhängig von der proteolytischen Spaltung durch die entsprechende Serinprotease. Die Testung der Effizienz dieser Peptide erfolgte hauptsächlich mittels Kalziumfreisetzungssassays an Thrombozyten sowie in Plättchenaggregationsassays<sup>151</sup>. Dargestellt sind im Folgenden ausschließlich Erkenntnisse zu den in dieser Arbeit verwendeten Agonisten für die Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4. Zusätzlich, wenn vorhanden, Angaben zu den Auswirkungen dieser Stimulation auf Zellpopulationen der Haut.

**PAR1-AP.** Endothelzellen, die mit dem spezifischen PAR1-AP TFLLRNPNDK oder mit Thrombin stimuliert wurden, zeigten eine erhöhte Expression von ICAM-1<sup>152</sup>. Zusätzlich konnten vasokonstriktorische Effekte und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität in pulmonalen Mikrogefäßen über PAR1 vermittelt werden<sup>153</sup>.

**PAR4-AP.** Nach Stimulation mit dem spezifischen PAR4-AP AYPGKF veränderten murine alveoläre Endothelzellen ihre Morphologie<sup>154</sup>. Die Stimulation von Fibroblasten mit dem spezifischen PAR4-AP führte zu einer erhöhten Freisetzung von intrazellulärem Kalzium<sup>155</sup>. Die Behandlung mit diesem Peptid löste in einem murinen Modell der Arthritis, der Carrageenan-induzierten Gelenkentzündung, einen erhöhten Blutfluß, eine Ödembildung sowie eine erhöhte Sensibilität gegen thermale Reize aus. In gleichem Maße wurde durch die Behandlung mit dem PAR4-AP die mechanische Allodynia und Hyperalgesie beeinflusst<sup>156</sup>.

#### 1.3.4.2 Antagonisten

Zusätzlich zu den AP wurden antagonistische Peptide (AtP) basierend auf der Peptidsignalsequenz entwickelt. Die Modifizierung der „tethered ligand“ Sequenz, beispielsweise durch Austausch oder Hinzufügen von Aminosäuren, führt zu einem Rezeptor-blockierenden Peptid. Im Zuge der Erforschung der AtP wurden durch die Verwendung von biochemischen Hochdurchsatzverfahren auch Antagonisten entwickelt, die nicht auf der Peptidstruktur des „tethered ligand“ beruhen<sup>151</sup>. Dargestellt sind hier vorrangig die Erkenntnisse zu den in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten sowie wenn möglich zu den Effekten auf Zellpopulationen in der Haut für die Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4.

**PAR1-AtP.** Das PAR1-AtP trans-cinnamoyl-para-fluoro-F-para-guanidino-FLR, BMS-200261, wurde schon in den 1990er Jahren entwickelt. Eine Inkubation mit diesem Peptid führte zu einer Inhibierung der Plättchenaggregation sowie der Kalziumfreisetzung in murinen Fibroblasten und humanen glatten Muskelzellen<sup>157</sup>.

**SCH79797.** Der PAR1 selektive Antagonist SCH79797 beruht nicht auf der Peptidstruktur des „tethered ligand“ Sequenz, sondern gehört zur Gruppe der Azole, welche aromatische heterozyklischen chemische Verbindungen sind. Die Inkubation mit diesem chemischen Antagonisten führte zu einer selektiven Hemmung der Plättchenaggregation<sup>158</sup> sowie des Kalziumeinstroms bei humanen Thrombozyten und glatten Muskelzellen nach Stimulation mit Thrombin oder mit PAR1-AP<sup>159</sup>.

**PAR4-AtP.** Die Verwendung des trans-cinnamoyl-YPGF, einem selektiven PAR4-AtP<sup>160</sup>, führte zu einer selektiven Hemmung der Plättchenaggregation. Die Stimulation mit Thrombin oder dem PAR4-AP resultierte in einer Freisetzung von Endostatin, einem Inhibitor der Angiogenese, aus Plättchen. Diese Mediatorfreisetzung kann durch Inkubation mit dem PAR4-AtP gehemmt werden<sup>161</sup>. In einem Modell der durch Ischämie-Reperfusion hervorgerufenen Schäden führte die Blockierung des PAR4 mit diesem Peptid zu einer Verringerung der induzierten Schäden<sup>162</sup>.

Die Verwendung dieser Rezeptor-aktivierenden Agonisten und Rezeptor-blockierenden Antagonisten ermöglicht eine gezielte Untersuchung der Funktion und Bedeutung der PAR im Verlauf von physiologischen oder pathophysiologischen Reaktionen<sup>126,151</sup>.

#### 1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Promotion soll das Expressionsmusters von Thrombinrezeptoren (PAR1, 3 und 4) in primären murinen MZ sowie die Aktivierung der primären murinen MZ durch Thrombin untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es weiterhin, festzustellen, welche Mediatoren nach Aktivierung von verschiedenen primären murinen MZ-Typen über Thrombin freigesetzt werden können und inwieweit diese in der Lage sind, anschließende Reaktionen zu modulieren. Durch die Stimulation mit PAR-Agonisten soll untersucht werden, welcher der Thrombinrezeptoren an der Aktivierung der MZ beteiligt ist. Durch eine Blockade der Thrombin-induzierten Prozesse durch PAR-Antagonisten soll überprüft werden, ob eine PAR-Aktivierung auch synergistisch wirken kann. Die anschließenden Analysen sollen klären, ob eine MZ-Aktivierung über Thrombin auch *in vivo* von Relevanz ist. Um die Rolle der MZ in diesem Prozess genauer zu charakterisieren sollen Wildtyp-Mäuse, MZ-defiziente Mäuse und lokal rekonstituierte Mäuse untersucht werden.

Anhand dieser *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit MZ als Effektorzellen von Thrombin- und / oder PAR-vermittelten Signalen fungieren können. Die Beantwortung dieser Fragen liefert grundlegende Erkenntnisse über die Rolle der MZ innerhalb von Entzündungsprozessen und die Mechanismen der Entzündungsreaktion sowie deren Kontrolle.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	HeraCell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Digitalkamera	Axio Cam	Zeiss, Jena, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	BD, Heidelberg, Deutschland
Elektronische Waagen	LA 4200 und PT120	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Elektronische Pipette	Handy Step®	Brand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
Elektrophoresekammer	Subcell GT System Mini GT System	Bio-Rad, München, Deutschland
ELISA-Reader	Dynex MRX version 1.33	DYNATECH, Chantilly, USA
Fluoreszenzmessgerät	MRX, Lamda Fluoro 320	BioTec® Instruments, Winooski, USA
Gel-Dokumentationsgerät	GENE GENIUS	SYNGENE, Cambridge, UK
Gewebeeinbettstation	Shandon Citadel Shandon Histocentre 2	Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland
µl-Spritze	50 µl, 100 µl	HAMILTON, Bonaduz, Schweiz
Inkubator	HERA cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
LightCycler® 1.5	1.5 Instrument	Roche, Mannheim, Deutschland
Magnet	EasySep®Magnet	Stem Cell Technologies, Grenoble, Frankreich
Magnetrührer	MR Hei-Mix L	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette	5 µl – 50 µl, 50 µl – 300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle		Bosch, München, Deutschland
Mikroskop		
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (invers)	CKX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskopkamera	Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotom	Shandon Finesse 325	Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland
Neubauer-improved	Tiefe 0,1 mm; 1 Großquadrat 1 mm <sup>2</sup>	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Orbital-Schwenker	Vibramax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
pH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Brand, GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Präparierbesteck	verschiedene Scheren, verschiedene Pinzetten	Aesculap Braun, Tuttlingen Deutschland
Produktschutzbank	Sterilbank	Schutzlufttechnik GmbH, Burladingen, Deutschland
Thermocycler	Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Primus 96 Plus, Primus	MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland
Thermodrucker	UP-D895	Sony, Deutschland
Thermomixer	MTP	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Model 72020	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	WBT 222	Medingen, Dresden, Deutschland
Paraffin-Streckbad	1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wärmeschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugen	Fresco 21	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Eppendorf 5417R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
Biopsiekassetten	Verschiedene Größen	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	24 x 46 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Handschuhe	Pudolfrei, Charité Universitätsmedizin	Emerson & Co, Genua, Italien TERANG NUSA, Kota Bharu, Malaysia
Kanülen, steril	30 G, 0,3 x 13 mm	BD, Drogheda, Irland
	25 G, 0,5 x 25 mm	BD, S.A. Fraga (Huesca) Spanien

	23 G, 0,6 x 30 mm	
Light Cycler® Capillaries	20 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
Objektträger	Superfrost ®	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Papierfilter	90 mm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	ungestopft: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl gestopft: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl, 300 µl	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
QiaShredder		Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße, steril	0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
	0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml	Deutschland
Reaktionsgefäße	8-Tube Strips 0,2 ml	Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
Röhrchen	15 ml, 50 ml	Falcon / BD, Heidelberg, Deutschland
Separationsfilter		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Spritzen	5 ml, 10 ml, 60 ml	BD, Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Thermodruckpapier		Mitsubishi, Düsseldorf, Deutschland
Zellkulturflaschen, steril		
7,5 cm <sup>2</sup>	Gewebe	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
25 cm <sup>2</sup>	Gewebe	
75 cm <sup>2</sup>	Gewebe	
Zellkulturplatten, steril		
24 Kavitäten	Cellstar®	Greiner Bio-one GmbH, Solingen, Deutschland
96 Kavitäten	Cellstar®	
96 Kavitäten (ELISA)	Maxi sorb	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	5 ml	BD, Heidelberg, Deutschland

## 2.3 Reagenzien und Chemikalien

### Substanz

### Hersteller



---

Alpha Monothioglycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Beta-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LE-Agarose (electrophoresis grade)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bovines Serumalbumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Holland
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNase	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTPs	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eosin-Phloxin	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol RNA grade	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol 70%, 96%, absolut (vergällt)	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
FACS-Flow	BD Pharmingen, San Diego, USA
Giemsas Azur Eosin-Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Ferak, Berlin, Deutschland
Haemalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Histodenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Imersionsöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Limonene-Mount	BioMeda, Foster City, USA
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd 4%	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung, 0,9 %NaCl	Braun, Melsungen, Deutschland
Rekombinates IL-3	Biosource, Nivelles, Belgien
Rekombinantes SCF	Biosource, Nivelles, Belgien
Primer	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Standard „Molecular Weight marker XIII“	Roche, Mannheim, Deutschland
Thrombin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach konzentriert	GIBCO®, Invitrogen Co., Paisley, UK
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
para-Nitrophenylen-N-acethyl-β,D- glucosamine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TritonX100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween®20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasser, steril	Braun, Melsungen, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.4 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNase I Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green	Roche, Mannheim, Deutschland
EasySep® PE-selection kit, 18554 (Mouse)	StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich
MACS CD117 MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
OptEIA™TNF mouse	BD, Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
OptEIA™ MCP-1 mouse	BD, Biosciences Pharmingen, Heidelberg,

HIS EIA-4005

Deutschland

DRG Diagnostics, Marburg, Deutschland

**2.5 Medien****Medium**

IMDM

Hybridoma SFM

Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640

Nicht-essentielle Aminosäuren

Fötales Kälberserum (FCS)

**Hersteller**PAA Laboratories GmbH, Cölbe,  
Deutschland

Gibco, Invitrogen Co., Paisley, UK

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

PAA Laboratories GmbH, Cölbe,  
Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

**BMCMC Kulturmedium**

IMDM

FCS 10 %

P/S 1 %

X63-konditioniertes Medium 20 %

 $\alpha$ MTG 0,002 %**PCMC Kulturmedium**

RPMI

FCS 5 %

P/S 1 %

 $\alpha$ MTG 0,002 %

IL3 10 ng / ml

SCF 30 ng / ml

**Seperationsmedium**

PBS

EDTA

FCS 2 %

**Transportmedium**

IMDM

P/S 10 %

**X-63 Kulturmedium**

Hybridoma SFM  
FCS 2 %  
P/S 1%  
nicht-essentielle Aminosäuren 1 %

**2.6 Puffer und Lösungen****Agarosegel-Lösung mit EtBr (2%)**

Agarose 2 % Agarose 2 %  
TAE einmal  
µg / ml EtBr

**Cacodylat-Puffer (0,2 M)**

Cacodylatsalz 8,56 g  
HCL 1N 2 ml  
NaN<sub>3</sub> 0,08 g  
ad 200 ml didest. H<sub>2</sub>O

**FACS-Puffer**

PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>  
BSA 2%

**Karnowskys-Lösung**

Paraformaldehyde 2%  
Glutaraldehyde 2,5 %  
Cacodylate Buffer 0,1 M  
CaCl<sub>2</sub> 0,025 %

**Ladepuffer**

EDTA 10 mM  
Bromphenolblau 0,25%  
Glycerol

**Lysepuffer**

Tyrodes Puffer  
TritonX-100 1%

**pNAG**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M  
Zitronensäure 0,4 M  
35 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 10 ml  
Zitronensäure  
pH auf 4,5 mit NaOH einstellen

	154 mg pNAG zugeben auf 112,5 ml mit dest. H <sub>2</sub> O auffüllen
<b>Trypanblau-Lösung (1:2)</b>	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> Trypanblau-Lösung
<b>Tyrodes Puffer</b>	dest. H <sub>2</sub> O KCl 5 mM NaCl 130 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> 1,4 mM Hepes 10 mM ad 1 l Glucose 5,6 mM frisch zusetzen BSA 0,01 % frisch zusetzen
<b>Stopplösung</b>	dest. H <sub>2</sub> O Glycin 200mM pH mit NaOH auf 10,7 einstellen auf 100 ml auffüllen
<b>Waschpuffer (pH 7,6) einmal</b>	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> Tween-20 0,05%

## 2.7 Antikörper

Konjugat, Antigen, Isotyp	Clonnummer	Hersteller
FITC-konjugiert FcεRIα IgG1 Ratte anti-Maus mAK	MAR1	eBioscience San Diego, USA
FITC-konjugiert CD117 IgG2b, κ Ratte anti-Maus mAK	2B8	eBioscience, San Diego, USA
PE-konjugiert FcεRIα IgG1 Ratte anti-Maus mAK	MAR1	eBioscience, San Diego, USA
PE-konjugiert CD117 IgG2b, κ Ratte anti-Maus mAK	2B8	eBioscience, San Diego, USA
PE-konjugiert CD3 IgG2b, κ	17A2	BD Biosciences Pharmingen,

Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
PE- konjugiert CD11c IgG1, $\lambda$ 2	HL3	BD Biosciences Pharmingen,
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
PE-conjugated CD19 IgG2a, $\kappa$	1D3	BD Biosciences Pharmingen,
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
PE-conjugated CD90.2 IgG2a, $\kappa$	53-2.1	BD Biosciences Pharmingen,
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
<b>Isotypkontrolle</b>	<b>Klonnummer</b>	<b>Hersteller</b>
FITC-konjugiert IgG1	299Arm	eBioscience, San Diego,
Hamster anti-Maus mAK		USA
FITC-konjugiert IgG2a, $\kappa$	R35-95	BD Biosciences Pharmingen,
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
PE-konjugiert IgG1	299Arm	eBioscience, San Diego,
Ratte anti-Maus mAK		USA
PE-konjugiert IgG2a, $\kappa$	R35-95	BD Biosciences Pharmingen,
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland
PE-konjugiert IgG2b, $\kappa$	A95-1	BD Biosciences Pharmingen
Ratte anti-Maus mAK		Heidelberg, Deutschland

## 2.8 primäre Zellen, Zelllinien, Mäuse

### Primäre Zellen

C57BL/6 BMCMCs

C57BL/6 PCMCs

### Herkunft

eigene Zucht

eigene Zucht

### Zelllinien

X63

### Herkunft

Prof. Dr. Jessberger, Universität Jena,  
Deutschland

### Mäuse

C57BL/6

C57BL/6

C57BL/6 *W-sh/W-sh*

C57BL/6 *MCP4<sup>-/-</sup>*

### Herkunft

eigene Zucht

Charles River, Deutschland

eigene Zucht

Kooperationspartner Uppsala, Schweden

---

## 2.9 Software

### Software

Axio Vision Revaluation 4.6

FCSExpress Version 3

Light Cycler Software Version 3

NCBI databases

Primer 3

Revaluation G3.2

Fluoreszenzmessung

Geldokumentation

CellQuest™

### Hersteller

Carl Zeiss, Jena, Deutschland

De Novo Software, Los Angeles, USA

Roche, Mannheim, Deutschland

National Center for Biotechnology  
Information, Bethesda, USA

SourceForge, Mountain View, USA

DYNEX, Berlin, Deutschland

KC4, BioTec® Instruments Inc.,  
Winooski, USA

GeneSnap, Syngen, Cambridge,  
Großbritannien

Becton Dickinson, Heidelberg,  
Deutschland

### 3 METHODEN

#### 3.1 Zellbiologische Arbeiten

##### 3.1.1 Primäre Zellen

###### 3.1.1.1 Isolation und Kultivierung knochenmarksgenerierter Mastzellen

C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäuse wurden in einem Exsikkator durch isofluranhaltige Dämpfe betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und anschließend desinfiziert. Durch Abpräparieren der Haut und Muskulatur um die Basis der Hinterläufe wurden Oberschenkel- (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) freigelegt. Nach erfolgter Dislokation der Hüfte sowie der Abtrennung der Sehnen und des restlichen Muskelgewebes von den Knochen wurden diese in 50 ml BMCMC-Waschmedium gegeben und unter sterilen Bedingungen weiter verarbeitet. Die Kondylen wurden entfernt, das Knochenmark mit BMCMC-Waschmedium unter Verwendung einer 20 G Kanüle herausgespült und gründlich resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 20 ml BMCMC-Kulturmedium aufgenommen, in eine Gewebe-Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

An Tag 5, 8, 10 und 15 der Kultur erfolgte ein kompletter Mediumwechsel, um adhärente Zellen zu entfernen. Dafür wurden die Zellen bei 1200 U pro min bei 4°C für 10 min zentrifugiert, in 20 ml frisches BMCMC-Kulturmedium aufgenommen und in eine neue, 75 cm<sup>2</sup> große, Gewebe-Zellkulturflasche umgesetzt. An Tag 19 erfolgte ein halber Mediumwechsel. Dafür wurden 10 ml der Zellsuspension entnommen und zentrifugiert (siehe oben). Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml frischem BMCMC-Kulturmedium aufgenommen und in die Flasche zurückgegeben. In einem wöchentlichen Rhythmus aus komplettem und halbem Mediumwechseln wurde bis zur Verwendung der Zellen ab einem Alter von 5 und 7 Wochen fortgefahren. Zur Bestimmung der Reinheit erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse (3.7.1.1) mittels Antikörpern gegen CD117 und Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ . Bei einer Reinheit von mehr als 95% wurden die Zellen für die Versuche genutzt.

###### 3.1.1.2 Isolation und Kultivierung peritonealer Mastzellen

Die Betäubung der C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäuse erfolgte in einem Exsikkator durch isofluranhaltige Dämpfe. Anschließend wurden sie durch zervikale Dislokation getötet und desinfiziert. Es erfolgte ein kleiner Einschnitt in die Bauchhaut. Durch anschließendes stumpfes Abpräparieren der Haut wurde das Bauchfell (Peritoneum) freigelegt und mit einer alkoholhaltigen Lösung desinfiziert. Mittels einer 26G-Kanüle und einer 10 ml Spritze wurden 5 ml Luft und 5 ml Natriumchlorid (NaCl) langsam in den Bauchraum gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, kein inneres Organ und auch kein Gefäß zu verletzen. Für 3 min wurde die



Maus hin und her bewegt, um ein Lösen der Zellen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde mit einer 20G Kanüle entnommen, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und 1200 U pro min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PCMC-Kulturmedium entsprechend der Anzahl der lavagierten Mäuse (1 Maus = 1 ml) aufgenommen und die Zellzahl nach Mastzell-spezifischer Färbung (3.2.4.2) bestimmt. Anschließend wurden drei- bis viermal  $10^4$  Zellen pro ml in 5 ml PCMC-Kulturmedium, konditioniert mit IL-3 (10ng/ml) und SCF (30ng/ml), in einer Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. An Tag zwei wurde die Zellsuspension abgenommen, die verbleibenden adhären Zellen wurden pro Flasche mit 5 ml frischem PCMC-Kulturmedium versorgt, und mit IL-3 und SCF versetzt. An Tag 5 wurden weitere 5 ml frisches Medium mit IL-3 und SCF zur Kultur gegeben. Am Tag 8 oder 9 wurden die Zellen für den Versuch genutzt.

### 3.1.2 Zellzählung

#### 3.1.2.1 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau Färbung

Zur Ermittlung der Zellzahl sowie zur gleichzeitigen Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension 1:2 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Da tote Zellen ihre Membranintegrität verlieren, kann der blaue Farbstoff in die Zellen diffundieren. Die gefärbten sowie die ungefärbten Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammerfaktors wurde die Zellzahl wie folgt bestimmt:

Ungefärbte Zellen x  $10^4$  (Kammerfaktor) x Verdünnung = Zahl der lebenden Zellen pro ml  
Gefärbte Zellen x  $10^4$  (Kammerfaktor) x Verdünnung = Zahl der toten Zellen pro ml

#### 3.1.2.2 Mastzell-spezifische Färbung

Zur Überprüfung der Mastzellreinheit wurden 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension 1:2 mit einer Kimura-Lösung<sup>163</sup> versetzt. Diese färbt spezifisch die Proteoglykane in Mastzellen lila an. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurden alle gefärbten sowie ungefärbten Zellen gezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammerfaktors wurde die Zahl der Mastzellen wie folgt bestimmt:

Gefärbte Zellen x  $10^4$  (Kammerfaktor) x Verdünnung = Zahl der Mastzellen pro ml  
Ungefärbte Zellen x  $10^4$  (Kammerfaktor) x Verdünnung = Zahl der Nicht-Mastzellen pro ml

### **3.1.3 Zelllinien**

#### **3.1.3.1 Hybridomzellen X63**

Die Hybridomzellen X63 produzieren murines IL-3. Dieses wird von MZ zur Reifung benötigt. Die Kultivierung der in Suspension wachsenden Hybridomzellen erfolgte in Suspensionszellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> mit 50 - 100 ml X63-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit X63-Medium versorgt bzw. das Kulturmedium komplett gewechselt. Der Überstand wurde durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 pro U min für 10 min bei 4°C gewonnen, und anschließend durch einen 0,2 µm großen Filter filtriert und bei -20°C gelagert.

### **3.1.4 Aufreinigung der kultivierten peritonealen Mastzellen PCMCs**

#### **3.1.4.1 Dichtegradientenzentrifugation**

Eine häufig verwendete Methode zur Isolierung von Leukozyten ist die Aufreinigung einer gemischten Zellpopulation über einen Dichtegradienten. Das Prinzip dieser Aufreinigung besteht in der Zentrifugation der Zellsuspension auf einem Polymer geringerer Dichte als die zu isolierende Zellart. Zellen mit einer hohen Dichte, wie z.B. MZ, sammeln sich aufgrund der Zentrifugation im Zellpellett, Zellen geringerer Dichte hingegen sammeln sich auf dem Gradienten.

Die PCMCs wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, für 8 min 1200 U pro min bei 4°C zentrifugiert und auf eine Zellzahl von einmal 10<sup>6</sup> pro ml eingestellt. Die Histodenz-Lösung (Gradientenpolymer) wurde in verschiedenen Konzentrationen in einem Verhältnis von 19-21% Gewicht / Volumen FACS-Puffer angesetzt. Anschließend wurde die Gradientenlösung mit der Zellsuspension überschichtet und bei 483 g für 15 min bei 20 °C zentrifugiert, das Zellpellett in FACS-Puffer aufgenommen und die Reinheit der Mastzellen durchflusszytometrisch (3.7.1.1) über die Färbung von Fc<sub>ε</sub>R1α bestimmt.

#### **3.1.4.2 Aufreinigung über magnetische Partikel**

Bei der magnetischen Aufreinigung von Zellen wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Zum einen die negative Selektion, hier wurden die verunreinigenden Zellen markiert, zum anderen die positive Selektion, hier wurden die Zielzellen markiert.

##### **3.1.4.2.1 Negative Aufreinigung mittels EasySep® PE-selection Kit**

Bei der negativen Aufreinigung unter Verwendung des EasySep® PE-selection Kit der Firma StemCell Technologies wurden PCMC in Separationsmedium gewaschen, auf zweimal 10<sup>5</sup> pro 100 µl eingestellt und mit einem Fc-Block (3.7.1.1) für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Cocktail aus PE-markierten Antikörpern

(0,5 µg pro ml), spezifisch gegen CD3, CD19, CD11c und CD90.2 gerichtet, für 15 min in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Die so markierten Zellen wurden 15 min bei RT mit dem EasySep® PE Selection Cocktail und anschließend für 10 min bei RT mit den EasySep® magnetischen Nanopartikeln inkubiert. Dieses Separationsgemisch wurde mit Separationspuffer auf ein Endvolumen von 2,5 ml aufgefüllt und in den Magneten positioniert. Dies resultierte in der Ausbildung eines magnetischen Feldes, in dem die PE markierten, mit einem magnetischen Partikel gekennzeichneten Zellen im Reaktionsgefäß zurückgehalten wurden. Die unmarkierten Mastzellen befanden sich in der Suspension und wurden durch das Abgießen der Flüssigkeit isoliert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Eine anschließende durchflusszytometrische Untersuchung (3.7.1.1) ermöglichte eine Aussage über die Reinheit der MZ.

#### **3.1.4.2.2 Positive Aufreinigung mittels MACS CD117 MicroBeads**

Zur Aufreinigung der PCMCs wurde der MACS CD117 MicroBeads mouse der Firma Milteny verwendet. Bei dieser positiven Selektion wurden PCMC mit Separationsmedium gewaschen, auf zweimal  $10^5$  pro 100 µl eingestellt und mit einem Fc-Block (3.7.1.1) für 15 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Markierung der Zellen durch Inkubation mit dem CD117 MicroBeads für 15 min bei 4°C. Die so markierten Zellen wurden auf eine magnetische Säule, welche sich in einem der Größe entsprechenden Magneten befand, gegeben. Durch die Ausbildung eines magnetischen Feldes wurden die an magnetische Partikel gebundenen Zellen in der Säule zurückgehalten. Durch erneute Zugabe des Separationsmediums und zweimalige Wiederholung der Prozedur wurde die Reinheit der CD117-markierten Zellen erhöht. Anschließend wurde die Säule in ein passendes Reaktionsgefäß gesetzt, wodurch das magnetische Feld aufgehoben wurde. Durch Zugabe des Separationsmediums wurden die markierten Zellen aus der Säule eluiert. Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten MZ (3.7.1.1) zur Überprüfung der Reinheit.

#### **3.1.4.3 Durchflusszytometrische Sortierung**

Eine sehr sensitive Methode zur Separierung von Zellen stellt die durchflusszytometrische Sortierung dar. Die PCMC wurden zweimal in Separationsmedium gewaschen, auf zweimal  $10^5$  pro 100 µl eingestellt und mit einem Fc-Block (3.7.1.1) für 15 min bei RT inkubiert und erneut gewaschen (8 min 1200 U/min bei 4°C). Die Zellsuspension wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 15 min bei RT gefärbt. Der hochaffine Fc $\epsilon$ RI wurde mit einem FITC markierten Antikörper detektiert, die Gegenfärbung erfolgte mit einem Cocktail aus PE-markierten Antikörpern (3.7.1.1), in diesem Fall spezifisch gegen CD3, CD19, CD11c und CD90.2. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten, wurde die Separationslösung vor der durchflusszytometrischen Sortierung gewaschen und anschließend über einen Filter mit

einer Porengröße von 30 µm gegeben. Die anschließende Sortierung wurde an einem FACS-Aria-II Durchflußzytometer von Becton Dickinson durchgeführt.

### 3.2 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 3.2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden entsprechend den geltenden Tierschutzverordnungen des Landes Berlin entweder in der tierexperimentellen Einrichtung des Center for Cardiovascular Research der Charité am Campus Mitte oder in der Forschungseinrichtung Experimentelle Medizin Charité Berlin, Tierhaltung Pharmakologie und Toxikologie, bis zum Versuch gehalten. Die Unterbringung der Versuchstiere erfolgte nach geltenden Versuchstierbestimmungen in einem Typ III Käfig bei einem 12stündigen Nacht-Tag-Rhythmus. Die Käfigumgebung entsprach der Leitlinie 2007/526/EG, bestehend aus grober Einstreu, Nestbaumaterial, Nagehölzchen sowie Unterschlupfmöglichkeiten. Die Versuchstiere hatten jederzeit unbeschränkten Zugang zu Wasser und Futter.

Die C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäuse sind ein Inzuchtmausstamm und eigens für Tierversuche gezüchtet. Die Versuchstiere stammten aus eigener Zucht oder von dem anerkannten Versuchstierzüchter Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH.

Die C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> sind ein Inzuchtmausstamm und eigens für Tierversuche gezüchtet. Die verwendeten Tiere stammten aus der eigenen Zucht der Arbeitsgruppe.

Die C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> sind ein Inzuchtstamm und eigens für Tierversuche gezüchtet. Die Versuchstiere stammten aus dem Labor unseres Kooperationspartners, Arbeitsgruppe Dr. M. Åbrink, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Sweden.

#### 3.2.2 Rekonstitution von MZ-defizienten C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäusen mit BMCMC

Für die MZ-Rekonstitution von C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäusen wurden BMCMC aus dem Knochenmark von C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäusen generiert (3.1.1.1). Innerhalb von 24 h vor der Rekonstitution wurde die Reinheit mittels FACS-Analyse für die MZ-spezifischen Oberflächenmarker Fc<sub>ε</sub>RI und Kit (3.7.1.1) überprüft. Nach einer kurzzeitigen Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde den Empfängertieren die Zellsuspension (10<sup>6</sup> Zellen) in einem Volumen von 50µl einmalig intrakutan in das Ohr injiziert. Die Versuche wurden nach 4-5 Wochen durchgeführt, zu einem Zeitpunkt, an dem sich nach früheren Arbeiten den WT-Mäusen vergleichbare MZ-Populationen ausgebildet haben<sup>164</sup>. Die Überprüfung der Rekonstitution erfolgte histologisch (3.4.4).

### 3.2.3 *In vivo* Untersuchung der Stimulation von kutanen Mastzellen

Um zu untersuchen, ob kutane MZ *in vivo* via PAR durch Thrombin aktiviert werden, wurden die C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup>, die MZ-defizienten C57BL/6 *Kit*<sup>Wsh/Wsh</sup> und die rekonstituierten C57BL/6 *Kit*<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäuse einmalig mit einer intradermalen Injektion von Thrombin in einem Volumen von 20 µl pro Ohr behandelt. Als Negativkontrolle erfolgte eine Injektion von 20 µl NaCl als Lösungsmittelkontrolle (Vehikel) in das jeweils kontralaterale Ohr. Da hier insbesondere darauf zu achten ist, keine Gefäße zu verletzen, erfolgte eine kurzfristige Betäubung der Tiere durch Isofluran. Zur Analyse der Reaktion des kutanen Gewebes nach Thrombininjektion wurde die Ohrdicke der Ohren stündlich über einen Zeitraum von sechs Stunden gemessen. Da eine möglicherweise auftretende Spätreaktion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde bei einigen Tieren zusätzlich nach 24 h, 48 h und 72 h die Ohrdicke ermittelt.

Die Messung erfolgte mittels eines Kalipers (Mess-Schieber) der Firma Mitutoyo von Hand. Dieser zeichnet sich durch eine Genauigkeit von 15 µm aus. Um eine bestmögliche Messung der Ohrdicke zu gewährleisten, wurden die Tiere kurzzeitig mit Isofluran betäubt, da Bewegungen die Messwerte verfälschen können. Es wurde dreimal gemessen und aus diesen Werten der Mittelwert gebildet.

Im Anschluss an die Dokumentation der Ohrschwellung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Eine Biopsie der behandelten Ohren wurde in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet. Eine weitere Biopsie wurde zur Anfertigung von Semidünnschnitten in K2-Lösung fixiert (3.4).

## 3.3 Histologische Arbeiten

### 3.3.1 Herstellung von Paraffinblöcken und Paraffinschnitten

Zur Entwässerung der in 4%iger Paraformaldehydlösung aufbewahrten Organstücke wurden diese in einem Gewebeeinbettautomaten nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert.

- |                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| 1. H <sub>2</sub> O | 7. Ethanol absolut |
| 2. Ethanol 70 %     | 8. Ethanol absolut |
| 3. Ethanol 70 %     | 9. Xylol           |
| 4. Ethanol 96 %     | 10. Xylol          |
| 5. Ethanol 96 %     | 11. Paraffin       |
| 6. Ethanol absolut  | 12. Paraffin       |

Anschließend wurden die Präparate in flüssigem Paraffin eingebettet und nach dem Aushärten an einem Microtom in einer Dicke von etwa 4-5 µm geschnitten. Die Ohrschnitte

wurden luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgezogen und in einem Trockenschrank bei 60°C über Nacht getrocknet.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate für dreimal 10 min in Xylol und anschließend für je zweimal 5 min in eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol absolut, 96%, 70%) getaucht. Nach der Spülung mit Aqua dest. für dreimal 5 min wurde unmittelbar die Übersichtsfärbung oder die Mastzell-spezifische Färbung durchgeführt.

### **3.3.2 Herstellung der Semidünnschnitte**

Die Biopsien wurden über Nacht bei RT in K2-Lösung fixiert, anschließend in 0,1 M Cacodylat-Puffer überführt und bis zur Einbettung bei 4°C gelagert.

### **3.3.3 Haemalaun-Eosin-Färbung**

Die Haemalaun-Eosin-Färbung ist eine gute Übersichtsfärbung, bei der Haemalaun die Zellkerne blau, Eosin das Cytoplasma der Zellen rot färbt. Die Paraffinpräparate wurden für 60 sec mit frisch filtriertem Haemalaun behandelt. Nach anschließendem zehnmütigen Bläuen unter fließendem Leitungswasser und einer kurzen Spülung in Aqua dest. wurden die Präparate für eine Minute mit Eosin gefärbt. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. wurden die Präparate zur Entwässerung für je 3 min in eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, Ethanol absolut) und zum Abschluss für 2-3 min in Xylol getaucht. Die Präparate wurden mit Limonene-Mount eingedeckelt und bei RT aufbewahrt.

### **3.3.4 Giemsa-Färbung**

Die Giemsa-Färbung ermöglicht eine gute Differenzierung von MZ anhand der Anfärbung der metachromatischen MZ-Granula. Diese Granula färben sich rötlich-violett, die Zellkerne färben sich blau-dunkelblau, das umliegende Gewebe weist eine hell-rötliche Färbung auf.

#### **3.3.4.1 Paraffinschnitte**

Die Präparate wurden für 15 min in unverdünnter und filtrierter Giemsa's Azur Eosin-Methylenblau Lösung gefärbt. Im Anschluss wurde kurz in 0,1% Essigsäure differenziert, nachfolgend mit Aqua dest gespült sowie dreimal für 10 sec in absolutem Ethanol und zum Schluss dreimal 5 min in Xylol gespült. Die Präparate wurden mit Limonene-Mount eingedeckelt und bei RT aufbewahrt.

#### **3.3.4.2 Semi-dünn Schnitte**

Frisch angesetzte alkaline Giemsalösung wurde auf einen pH-Wert von 8,2 mit NaOH eingestellt. Die Präparate wurden für 40 min in dieser Lösung gefärbt, einmal mit

Leitungswasser und dreimal kurz in 50%iger Ethanollösung gespült. Anschließend wurden sie bei 60°C für 2 h im Ofen getrocknet, einmal in Xylol getaucht, mit Limonene-Mount eingedeckelt und bei RT aufbewahrt.

### 3.4 Proteinchemische Arbeiten

#### 3.4.1 $\beta$ -Hexosaminidase-Assay

Eine gängige Methode zur Überprüfung einer erfolgten Degranulation von MZ ist der Nachweis der Freisetzung des Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase.

Hierfür wurden MZ zweimal mit Tyrodespuffer gewaschen, auf eine Konzentration von  $10^6$  pro ml eingestellt und in eine Kunststoffplatte mit 96 Kavitäten á  $10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l pro Kavität eingesät. Die BMCMC wurden entweder mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin oder dem PAR1-AP stimuliert. Die PCMC wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin, dem PAR1- bzw. PAR4-AP sowie mit einem chemischen PAR1-Antagonisten stimuliert. Als Positivkontrolle wurde mit 2  $\mu$ M Ionomycin stimuliert, als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C bei 1200 U pro min, die Überstände wurden abgenommen und die Zellpellets mit Lysepuffer lysiert. Sowohl den Überständen als auch den Lysaten wurde im Verhältnis 1:1 das Substrat para-Nitrophenyl-N-acethyl- $\beta$ ,D-glucosamine zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine Stunde. Durch Zugabe der Stopplösung wurde die enzymatische Reaktion beendet. Der folgende Farbumschlag wurde an einem 96-Kavitäten Spektrometer bei 405 nm gemessen. Berechnet wurde die Freisetzung in Prozent anhand der optischen Dichte (OD) entsprechend nachfolgender Formel:

$$\frac{\text{OD Überstand}}{(\text{OD Überstand} + \text{OD Lysat})} \times 100$$

Formel 1: Berechnung der  $\beta$ -Hexoasaminidasefreisetzung

#### 3.4.2 Nachweis der Thrombinaktivität

Um nachzuweisen, dass Mastzellproteasen Thrombin degradieren können, wurde ein Test zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Thrombin durchgeführt. Hierfür wurden die PCMC zweimal mit PBS gewaschen, auf eine Konzentration von  $10^6$  pro ml eingestellt, in PCMC-Kulturmedium aufgenommen und anschließend zu je einem ml in eine Kavität einer Kunststoffplatte mit 24 Kavitäten eingesät. Die PCMC wurden entweder mit 2  $\mu$ M Ionomycin stimuliert oder unstimuliert gelassen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C und 5%

CO<sub>2</sub> erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C bei 1200 U pro min, die Überstände wurden abgenommen. Ein Aliquot wurde als „Nullwert“ eingefroren, der restliche Überstand in eine unbenutzte Kavität überführt. Dem Überstand der Ionomycin-stimulierten Zellen sowie dem Überstand der unstimulierten Zellen wurden 5 NIH (National Institutes of Health) Thrombin zugesetzt. Nach weiterer Inkubationszeit von 60, 90, 180 und 360 min wurden Aliquots abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Um die Thrombinaktivität in diesen Proben zu bestimmen, wurde der SensoLyte® AFC Thrombin Activity Assay Kit Fluorimetric verwendet und laut den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wird das Substrat durch Thrombin geschnitten, was in einer Freisetzung des Fluorochroms AFC (7-amido-4-trifluoromethylcoumarin) resultiert. Dieses freigesetzte Fluorochrom wurde mit 380 nm angeregt, und die Emission wurde bei 500 nm an einem Fluoreszenz-Spektrometer detektiert. Aus dem Abfall der messbaren Fluoreszenz ergibt sich das Ausmaß des Abbaus von Thrombins.

### **3.5 Molekularbiologische Arbeiten**

#### **3.5.1 RNA Aufreinigung**

Zur Gewinnung der RNA wurden mindestens 10<sup>6</sup> Mastzellen, sowohl BMCMC als auch PCMC, zweimal mit PBS gewaschen, pelletiert und in der RNA stabilisierenden Pufferlösung RNeasy Protect® von Cell Reagent von Qiagen aufgenommen um die Aktivität von RNAsen und somit den Abbau der RNA zu minimieren. Bis zur RNA Aufreinigung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Die RNA-Proben wurde entsprechend den Herstellerangaben des Qiagen Kit RNeasy Mini aufgereinigt. Dieses beruht auf einem Zweisäulenprinzip. Zuerst wurden die festen Zellbestandteile von den Nukleinsäuren getrennt. Mittels einer zweiten Säule wurden sie gefällt und gewaschen. Um eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA zu verhindern, wurde zusätzlich ein DNase Verdau durchgeführt. Die anschließende Eluierung der RNA erfolgte mit Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### **3.5.2 Die Polymerase-Kettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich definierte Bereiche der DNA vervielfältigen. Als Erstes erfolgt die Denaturierung der DNA, was die Anlagerung der Primer ermöglicht. Primer sind kurze Oligonukleotide, die zu je einem DNA-Strang komplementär sind. Sie binden an den DNA Strang und flankieren damit den Teil der DNA, der vervielfältigt werden soll, und sie bilden so den Startpunkt für die DNA-Polymerase. Eine der am



häufigsten verwendeten Polymerasen ist die des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq). Sie ist hitzestabil und ermöglicht in der Elongationsphase die Synthese eines neuen Stranges komplementär zum Matrizenstrang.

Eine PCR läuft in drei Schritten ab. Es erfolgt (1) die Denaturierung der DNA, (2) die Anlagerung der Primer in der sogenannte Annealing-Phase und (3) die Elongationsphase, in der die Synthese des neuen DNA Fragments erfolgt. Durch eine zyklische Wiederholung dieser Schritte erreicht man eine exponentielle Vervielfältigung des durch beide Primer flankierten DNA Stranges<sup>165</sup>.

### 3.5.3 Primerdesign

Um spezifische Primer zu generieren wurde die komplette mRNA Sequenz des zu untersuchenden Proteins aus der Datenbank des National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) ermittelt. Diese wurde mit der frei erhältlichen Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) auf mögliche Primer analysiert. Bestimmte Bedingungen wurden dabei beachtet. Die Primerlänge sollte 18-25 bp nicht über- oder unterschreiten. Das Verhältnis der Basen Guanidin und Cytosin sollte 40 bis 60% betragen. Die Schmelztemperatur des Primers sollte zwischen 55-63°C liegen, um einen möglichst großen Spielraum bei der Annealingtemperatur zu gewährleisten. Die Primer sollten nicht mehr als 4 gleiche aufeinander folgende Basen enthalten, um Fehlhybridisierungen oder Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Ebenso sollten die Primer eine geringe Komplementarität aufweisen und nicht mit sich selbst hybridisieren. Um das entstehende Produkt sowohl in einer klassischen als auch in einer quantitativen PCR nachweisen zu können, wurde eine PCR-Produktgröße von 80-150 bp angestrebt. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden diese Primer einer Untersuchung mit dem Basic Local Alignment Search Tool, kurz Primer BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen.

Die Primersequenzen für PAR3 wurden selbst generiert. Die Primersequenzen für PAR1 und 4 wurden von Frau Dr. Anke Rattenholl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Steinhoff aus Münster zur Verfügung gestellt. Die Primersequenzen für die HDC und die MCPT4 wurden von Frau Mandy Leist aus unserer Arbeitsgruppe generiert. Die Primersequenzen für die HPRT wurden von der Arbeitsgruppe Frau Prof. Margitta Worm aus Berlin zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Nucleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer mit den entsprechenden Annealingtemperaturen für die RT-PCR und Fragmentgröße

Gen	Primerssequenz forward	Primersequenz reverse	Annealingtemperatur für RT-PCR (C°)	Fragmentgröße (bp)
HPRT	CgTCgTgATTAgCgATgATg	AATCCAgCAggTCAgCAAAg	58	221
HDC	ggATTCTgggTCAAggACAA	AACCAAggTgCCTCTTAgCA	58	163
mMCP4	CAGCTACCTggTgggTTT	gTCAgAAggACgAggCAgAg	58	266
PAR1	TCTTgTgCCgTTgATCgTTTC	AACAAAgCCCgCgACTTCTT	52	102
PAR3	CATCCTgCTgTTTgTggTTg	gCCAggTTggTgTgAAAgAT	58	105
PAR4	TgggTCCCACAgTAGAACTCAAg	CTCCAgCgTgTCACTgTCgTT	58	101

### 3.5.4 Expressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine Standardmethode zur Expressionsanalyse eines zu untersuchenden Zielgens. Es erfolgt erstens die Umschreibung der RNA auf *complementary* DNA (cDNA), zweitens die Amplifikation des zu untersuchenden Gens mittels PCR (3.5.2) und drittens der Nachweis des PCR-Produktes anhand einer Agarosegelelektrophorese.

Die aufgereinigte Gesamt-RNA (Einzelstrang) wurde als Template für die Synthese der cDNA (Doppelstrang) genutzt. Für die RT-PCR finden hauptsächlich die Reverse Transkriptasen aus dem *avian myoblastosis virus* (AMV-RT) und die Reverse Transkriptase aus dem *moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) Verwendung. Die AMV-RT ist eine DNA-Polymerase, die RNA- oder DNA-abhängig DNA synthetisiert. Die optimale Arbeitstemperatur liegt bei 42°C. Als Primer werden in der Mehrheit entweder die Oligo-dT-Primer oder die zufälligen Hexamerprimer verwendet. Die Oligo-dT-Primer binden an den Poly-A-Schwanz der mRNA und synthetisieren die komplette cDNA der mRNA bis zum 5'-Ende. Von Vorteil ist hier, dass nur die mRNA umgeschrieben wird. Nachteilig ist, dass die DNA-Stränge nur bis zu einer Länge von 1-2 kb synthetisiert werden, die mRNA allerdings deutlich länger sein kann und der proteinkodierende Teil sich meist am 5'-Ende befindet. Um diesen Nachteil zu umgehen, nutzt man die zufälligen Hexamerprimer, die beliebig an RNA hybridisieren und somit alle Bereiche umschreiben.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das 1st Strand cDNA Synthese Kit von Roche verwendet. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu gewährleisten, wurden die Hexamerprimer verwendet. Der Reaktionsansatz enthält 8 µl des Templates, 2 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl Primer, 2 µl 10mM dNTP-Mix, 1 µl 50 Units RNase Inhibitor und 0,8 µl 25 Units AMV-RT. Eine Inkubation des Ansatzes von 10 min bei 25°C gewährleistet die Bindung der Primer an das Template. In den anschließenden 60 min bei 42°C erfolgte die cDNA Synthese durch die AMV-RT. Eine abschließende Erhitzung auf 99°C für 5 min führt zur Denaturierung der AMV-RT und verhindert dadurch mögliche

unerwünschte Interaktionen des Enzyms in den folgenden PCR-Reaktionen. Genutzt wurde der Cyclotherm der Firma Thermo, Modell Primus 96. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die anschließende Untersuchung der verschiedenen Proben mittels PCR wurde folgender Reaktionsansatz (Tabelle 4A) verwendet. Das PCR-Programm (Tabelle 4B) war für alle untersuchten Gene gleich, nur die Annealingtemperatur für die jeweiligen Primer war verschieden (Tabelle unter 3.5.3).

Tabelle 4: Expressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase-PCR  
A) Übersicht über den verwendeten Reaktionsansatz B) Übersicht über das genutzte PCR-Programm für die RT-PCR

A

Reagenzien	Konzentration	1x Ansatz
Puffer	10x	2,5 µl
dNTP-Mix	2 mM	2,5 µl
primer forward	10 pmol	1,0 µl
primer reverse	10 pmol	1,0 µl
H <sub>2</sub> O		15,9 µl
Taq		0,1 µl
Template		2,0 µl

B

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2 min
Zyklus 40 x		
Denaturierung	94°C	15 sec.
Annealing-Phase	verschieden	15 sec.
Elongation	72°C	15 sec
Elongation	72°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

Um eine erfolgreiche Amplifizierung des zu untersuchenden DNA-Stranges nachzuweisen, erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Dies ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und gleichzeitiger Größenbestimmung anhand eines DNA-Standards. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein 2%iges Agarosegel genutzt, welches mit 0,5 µg pro ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt wurde. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine mit Kämme bestückte Gelkammer gefüllt. Nach dem Erstarren wurden die Kämme entfernt und je 10 µl PCR-Produkt, mit 5 µl sechsfachem Probenpuffer gemischt, und in die Geltaschen gefüllt. Der Probenpuffer dient zur Beschwerung und gleichzeitig zur Anfärbung der Probe, was das Auftragen erleichtert und eine Beobachtung der Laufweite im Gel ermöglicht. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde stets DNA-Standard-Marker in eine Geltasche gegeben und mit den Proben elektrophoriert. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h in TAE-Puffer bei 120 V. Durch UV-Bestrahlung des Gels wurden die Produktbanden sichtbar. Diese Visualisierung wurde durch das in die DNA interkalierte EtBr möglich. Die anschließende Dokumentation erfolgte photographisch.

### 3.5.5 Real-time quantitative PCR

Bei dieser Methode erfolgt die Quantifizierung der Proben unter Berücksichtigung der Kinetik einer PCR-Reaktion (3.5.2). Um diese zu messen werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet. In dieser Arbeit wurde das FastStart SYBR Green Master Kit von Roche genutzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Das Reaktionsvolumen wurde auf 5 µl reduziert. Der Reaktionsansatz enthielt 2 µl cDNA, je 0,25 µl Primer,  $\text{MgCl}_2$  (siehe Tabelle), 1,2 µl Wasser und 0,5 µl aus einem Mix des LightCycler Fast-Start Enzym und dem LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Als Negativkontrolle fungierte Wasser an Stelle des Templates.

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen von  $\text{MgCl}_2$  und Primern sowie Annealingtemperatur und Effizienz für die real-time quantitative PCR

Gen	$\text{MgCl}_2$ – Konzentration (mM)	Primerkonzentration (nM)	Annealingtemperatur (°C)	Effizienz
HPRT	4	500	60	1,91
HDC	4	250	60	1,99
mMCP4	5	250	60	1,83
PAR-1	3	250	60	2,23
PAR-3	4	250	60	2,055
PAR-4	5	250	59	2,0

Der hier verwendete fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I, welcher nur an doppelsträngige Moleküle bindet, weist ungebunden eine geringe Fluoreszenz auf. Nach dem Annealing-Schritt interkaliert SYBR Green I an die doppelsträngige DNA, was in einem deutlichen Anstieg der Emittierung der Fluoreszenz resultiert. Während der Elongation binden immer mehr SYBR Green I Moleküle an die neusynthetisierte DNA. Im Verlauf des Denaturierungsschrittes vor dem nächsten Zyklus löst sich der Farbstoff und das Fluoreszenzsignal fällt. Die Fluoreszenzmessung am Ende jedes einzelnen Elongationsschrittes und die gleichzeitige Aufzeichnung ermöglichen die Visualisierung des proportionalen Anstiegs an amplifizierter DNA in Echtzeit (real-time).

Eine Quantifizierung erreicht man durch eine Normalisierung der zu untersuchenden Gene auf ein Haushaltsgen. Dieses entspricht einer endogenen Kontrolle, die eine Korrektur einer möglichen Variation an RNA Menge, der cDNA Synthese oder aber in der Effizienz der Amplifikation ermöglicht. Im Idealfall zeigt dieses Gen kontinuierlich ein gleiches Expressionsniveau, sowohl in verschiedenen Geweben als auch unter verschiedenen experimentellen Konditionen. Genutzt wurde hier das Gen für das Enzym Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), ein Enzym des Purinstoffwechsels bei Eukaryoten.

Die Berechnung des Verhältnisses des zu untersuchenden Gens zum Haushaltsgen erfolgte durch die Analyse der Crossing Points ( $C_P$ ). Die relative Expression (R) eines Gens ergibt

sich aus der Effizienz (E) und den Crossing Points des zu untersuchenden Gens im Verhältnis zu denen des Haushaltsgens.

$$R = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta\text{CpZiel(Kontrolle-Probe)}}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta\text{CpReferenz(Kontrolle-Probe)}}}$$

Formel 2:  $\Delta\Delta\text{Cp}$  Methode für die Quantifizierung von mRNA

### 3.6 Immunologische Arbeiten

#### 3.6.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung physikalischer und, nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, auch antigener und biochemischer Eigenschaften von Zellen. Hierfür werden die Zellen als Einzelzellsuspension an einem 488 nm Argon-Laser und einem 635 nm Diodenlaser vorbeigeführt. Aufgrund der zellspezifischen Lichtstreuung gibt der FSC (forward light scatter) Aufschluss über die Größe der Zellen, der SSC (sideward light scatter) über die Granularität des Zytoplasmas. Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen über spezifische Antigene durch Antikörper mit daran gekoppelten Fluorochromen, wie z.B. Fluoresceine Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC), ermöglicht eine weitere Parameteranalyse. FITC wird im ersten Fluoreszenzkanal (FL1), PE in FL2 sowie APC in FL4 detektiert. Hierbei liegt das Emissionsmaximum für FL1 bei 530 nm, für FL2 bei 585 nm und für FL4 bei 650 nm. Die Anregung der Farbstoffe durch den Argon-Laser oder den Diodenlaserstrahl resultiert in der Ausstrahlung eines charakteristischen Emissionsspektrums. Dieses wird durch verschiedene Photozellen detektiert und aufgezeichnet. Eine bildgebende Software ermöglicht eine zweidimensionale Analyse. In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur™ Durchflusszytometer mit der dazugehörigen Software CellQuest verwendet. Für die Auswertung der FACS-Daten wurde die Software FCS Express 3 verwendet.

##### 3.6.1.1 Durchflusszytometrische-Analyse der Mastzellen

Sowohl die BMCMC als auch die PCMC wurden durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurden die Zellen für 8 min mit 1200 U pro min bei 4°C zentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und auf  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Eine Blockade möglicher unspezifischer Bindungen an den auf der Oberfläche vorhandenen  $\text{Fc}_\gamma$ -Rezeptor wurde durch eine anschließende Inkubation der Zellen mit dem spezifischen Fc-Block, 800 ng pro ml, für 15 min bei 4°C erreicht. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörper wurden die Zellen gewaschen. Für die Färbung wurden jeweils einmal  $10^5$  Zellen mit 0,5 µl Antikörperlösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl FACS-Puffer für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Durch zweimaliges Waschen der Zellen wurden die überschüssigen Antikörpermoleküle

entfernt. Die Zellen wurden in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse im KÜhlschrank aufbewahrt (höchstens 3 h).

### 3.6.2 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die PCMCs wurden zweimal mit PBS gewaschen, in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml in PCMC-Kulturmedium aufgenommen und anschließend in je 1 ml pro Kavität einer Kunststoffplatte mit 24 Kavitäten eingesät. Die Stimulation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin bzw. dem PAR1-AP. Als Positivkontrolle wurden mit 2 µM Ionomycin stimulierte Zellen, als Negativkontrolle unstimulierte Zellen verwendet. Nach einer Inkubation für 1 h bzw. 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C bei 1200 U pro min, der Überstand wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Untersuchung der Proben auf TNF und MCP-1 Freisetzung erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISAs dessen Prinzip auf der spezifischen Bindung von Antigen und Antikörper beruht. Eine speziell beschichtete Maxisorp® Kunststoffplatte der Firma Nunc wurde mit einem Antikörper (primärer Antikörper), spezifisch für ein Epitop der nachzuweisenden Substanz, beschichtet. Nach der anschließenden Inkubation mit der zu analysierenden Probe wurde ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper), spezifisch für ein anderes Epitop der nachzuweisenden Substanz, dazugegeben. Zusätzlich ist an diesen Sekundärantikörper ein Enzym gekoppelt, das bei Zugabe des entsprechenden Substrates zu einer Farbveränderung führt, die photometrisch gemessen wurde. Aufgrund der Mitführung eines Standards lässt sich die Konzentration der nachzuweisenden Substanz in der zu analysierenden Probe errechnen.

Für die Untersuchung der Histaminkonzentration wurde ein kommerziell erhältlicher kompetitiver ELISA verwendet. Das Prinzip des kompetitiven ELISAs beruht auf der Konkurrenz der Antigene um die spezifischen Bindungsstellen eines Antikörpers. Dieser ist auf den Boden einer Kunststoffplatte mit 96 Kavitäten gebunden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe und einer definierten Menge eines enzymmarkierten spezifischen Antigens kommt es zur Bindung an den Antikörper. Die Inkubation mit der Substratlösung führte zu einer Farbreaktion, die anschließend photometrisch bestimmt wurde. Die Intensität der Farbe ist hierbei umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Mitführung eines Standards ermöglicht die anschließende Bestimmung der Konzentration der zu untersuchenden Probe.

Bei allen verwendeten ELISAs wurde das empfohlene Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.7 Statistische Auswertung

Als Erstes wurden die Datensätze auf Normalverteilung mittels des Kolmogorow-Smirnow Tests untersucht. Lag eine Normalverteilung vor, wurde mit einem t-Test für gepaarte oder ungepaarte Stichproben, je nach Experiment fortgefahren. Konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, wurden unabhängige Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert, abhängige Stichproben mit dem Wilcoxon-Test (Vorzeichenrangtest). Der Vergleich der Mausgruppen hinsichtlich der Ohrschwellung erfolgte mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA - **analysis of variance**). Das Signifikanzniveau wurde auf 95 % festgelegt. Als statistisch signifikant gilt \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Reinheit der Mastzellen

#### 4.1.1 Knochenmarks-generierte kultivierte Mastzellen stellen eine reine, homogene Zellpopulation dar

Um die Homogenität von generierten kultivierten BMCMC abzusichern, wurde deren Reinheit mittels Durchflusszytometrie anhand der Expression der MZ-spezifischen Oberflächenmarker  $Fc_\epsilon RI$  und Kit überprüft. Wie in Abb. 4 dargestellt, sind BMCMC eine sehr homogene und hochreine MZ-Population. Sowohl der  $Fc_\epsilon RI$  als auch Kit werden sehr stark exprimiert.

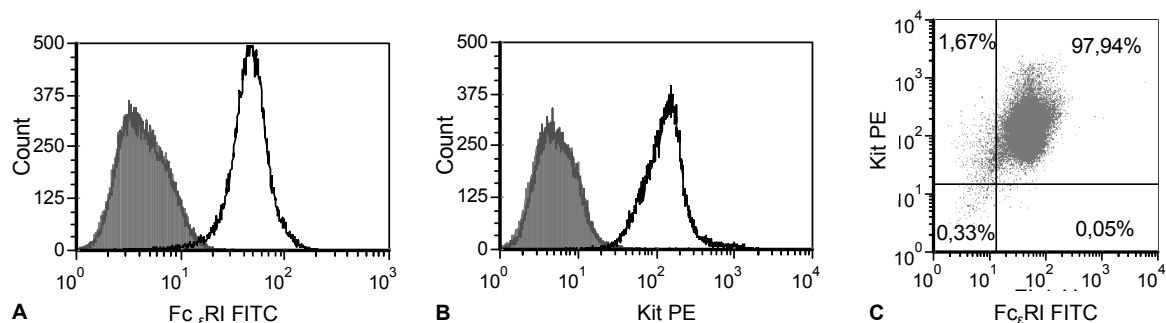


Abb. 4: Histogrammdarstellung der BMCMC. A)  $Fc_\epsilon RI$ , B) Kit. Die graue, gefüllte Fläche zeigt die ungefärbten Zellen, die dunkelgraue Kurve den entsprechenden Isotyp, die schwarze Kurve die spezifische Färbung. C) Der Dot Plot zeigt eine Doppelfärbung für  $Fc_\epsilon RI\alpha$  und Kit.

#### 4.1.2 Peritoneale, kultivierte Mastzellen müssen aufgereinigt werden

Im Gegensatz zu der Kultivierung der BMCMC führte die Kultivierung der PCMC auch zum Wachstum anderer Zellpopulationen. Neben der Hauptpopulation, den MZ, sind zusätzlich auch Fibroblasten und andere Leukozyten wie T- und B-Zellen sowie Makrophagen enthalten.

Abb. 5 zeigt die Färbungen sowohl für die MZ-spezifischen Oberflächenmarker Kit (Abb. 5A) und  $Fc_\epsilon RI$  (Abb. 5B) als auch für die charakteristischen Oberflächenmarker der verunreinigenden Zellpopulationen, CD3 (Abb. 5C) für T-Zellen, CD19 (Abb. 5D) für B-Zellen, CD11c (Abb. 5E) für Makrophagen und CD90.2 (Abb. 5F) für Fibroblasten. Wie in Abb 5 zu erkennen ist, haben die B-Zellen und die Makrophagen einen ähnlich hohen Anteil an der Verunreinigung der MZ. Zusätzlich sind, wenn auch deutlich weniger, Fibroblasten und T-Zellen enthalten.



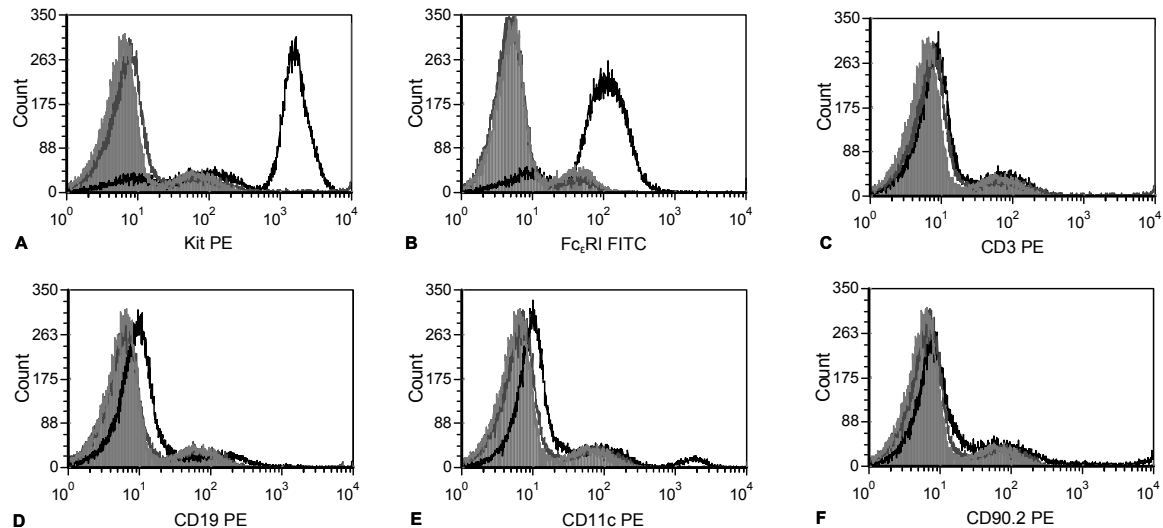


Abb. 5: Histogrammdarstellung der PCMC. A) Kit B)  $Fc_\epsilon RI$ , C) CD3, D) CD19), E) CD11c und F) CD90.2. Die graue, gefüllte Fläche zeigt die ungefärbten Zellen, die dunkelgraue Kurve den entsprechenden Isotyp, die schwarze Kurve die spezifische Färbung

Da die kontaminierenden Zellpopulationen ebenso wie die MZ verschiedene PAR exprimieren können<sup>127</sup>, war eine Aufreinigung nötig, um sicherzustellen, dass bei anschließenden Stimulationsversuchen ausschließlich die PCMC reagieren.

Zur Aufreinigung des heterogenen Zellgemischs wurden verschiedene Methoden verwendet, die Aufreinigung über einen Dichtgradienten, die negative und die positive Selektion mit magnetischen Partikeln sowie die Sortierung der Zellen am Durchflusszytometer.

#### 4.1.2.1 Die Aufreinigung von peritonealen, kultivierten Mastzellen über einen Dichtgradienten führt nicht zu einer ausreichenden Reinheit

Um eine reine MZ-Population zu erhalten, wurden die PCMC über einen Dichtgradienten aufgereinigt. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten MZ mit einem PE-markierten Antikörper gegen  $Fc_\epsilon RI\alpha$  (Abb. 6A) oder gegen Kit (Abb. 6B) zeigte, dass eine Reinheit von 90% positiven Zellen erreicht wurde.

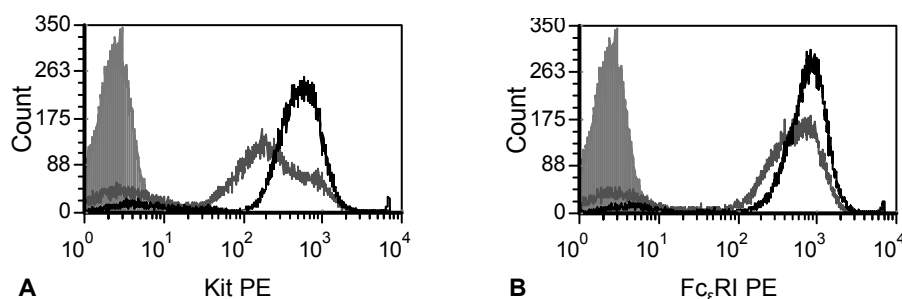


Abb. 6: Histogrammdarstellung der mittels Dichtgradienten aufgereinigten PCMC. A) Färbung der Zellpopulation gegen  $Fc_\epsilon RI\alpha$ , B) Färbung der Zellpopulation gegen Kit. Die graue, gefüllte Fläche zeigt die ungefärbten Zellen, die dunkelgraue Kurve die unaufgereinigten, gefärbten Zellen und die schwarze Kurve die aufgereinigten, gefärbten Zellen.

Aufgrund der nicht ausreichenden Reinheit konnten die Zellen nicht für die Stimulationsversuche oder zur RNA-Gewinnung verwendet werden.

#### 4.1.2.2 Die Aufreinigung von peritonealen, kultivierten Mastzellen über einen Magneten führt nicht zu einer ausreichenden Reinheit

Um eine höhere Reinheit der MZ-Population im Vergleich zu der Aufreinigung über den Dichtegradienten zu erzielen, wurden magnetische Partikel verwendet. Hierbei können die Zellen negativ über die Markierung und anschließende Selektion der verunreinigenden Zellpopulationen oder positiv über einen MZ-spezifischen Marker aufgereinigt werden.

Bei der negativen Selektion wurden alle unerwünschten Zellpopulationen (4.1.2) mit einem PE gekoppelten Antikörper gegen den jeweiligen Zell-spezifischen Oberflächenmarker markiert und mittels PE-spezifischer magnetischer Partikel isoliert. Abb. 7A zeigt die  $Fc_\epsilon RI\alpha$  gefärbten PCMC vor und nach der Aufreinigung, in Abb. 7B sind die PE-positiven Zellen (die verunreinigenden Zellpopulationen) vor und nach der Aufreinigung dargestellt. Die Reinheit der MZ-Fraktion nach negativer Selektion lag bei 94 %.

Bei der positiven Selektion wurden die MZ mit CD117 (Kit) MicroBeads markiert und isoliert. Eine anschließende durchflusszytometrische Analyse (Abb. 7C) der MZ zeigt diese vor und nach Aufreinigung. Die Reinheit der MZ nach positiver Selektion betrug 91 %.

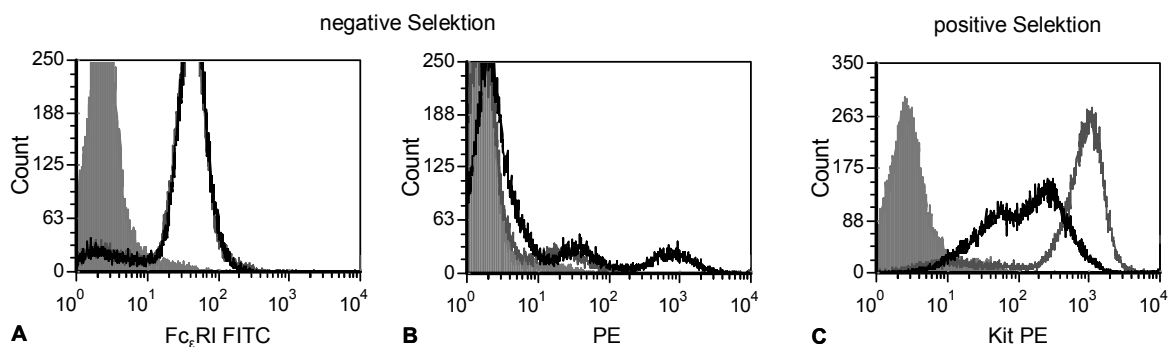


Abb. 7: Histogrammdarstellung der mittels magnetischer Partikel aufgereinigten PCMC. A) negative Selektion, Färbung der MZ-Population gegen  $Fc_\epsilon RI$ , B) negative Selektion, Färbung der Nicht-MZ-Population (CD11c, CD19, CD3, CD90.2) C) positive Selektion, MZ-Färbung gegen Kit. Die graue, gefüllte Fläche zeigt die ungefärbten Zellen, die dunkelgraue Kurve die unaufgereinigten, gefärbten Zellen und die schwarze Kurve die aufgereinigten, gefärbten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die negative als auch die positive Aufreinigung nicht zu einer hochreinen MZ-Population führen, die im Anschluß für Stimulationsversuche oder zur RNA-Aufreinigung verwendet werden sollte.

#### 4.1.2.3 Die Sortierung von peritonealen, kultivierten Mastzellen am Durchflusszytometer führt zu einer hochreinen Mastzellpopulation

Eine besonders effektive Methode zur Aufreinigung von Zellgemischen ist die Zellsortierung am Durchflusszytometer. Diese entspricht im Prinzip der positiven Selektion mit dem Unterschied, dass hier sowohl die gewünschte Zellpopulation als auch die unerwünschte Zellpopulation markiert und sortiert werden kann.

Die Verwendung dieser Methode führte zu einer hochreinen MZ-Population. In Abb. 8 sind die PCMC (Abb. 8A) und die verunreinigenden Zellpopulationen (Abb. 8B) dargestellt. Nach der Sortierung wurden 95% der PCMC positiv für  $Fc\epsilon RI$  gemessen. Aufgrund dieser hohen Reinheit, war für die Aufreinigung der PCMC die durchflusszytometrische Sortierung die Methode der Wahl.

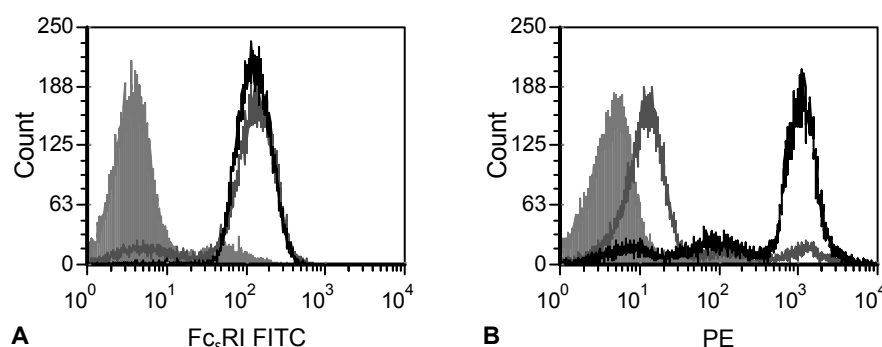


Abb. 8: Histogrammdarstellung der sortierten PCMC. A) die MZ-Fraktion, gefärbt gegen  $Fc\epsilon RI\alpha$ , B) die Nicht-MZ-Population, PE markiert gegen CD3, CD11c, CD19 und CD90.2. Die graue, gefüllte Fläche zeigt die ungefärbten, unaufgereinigten Zellen, die dunkelgraue Kurve die unsortierten, gefärbten Zellen und die schwarze Kurve die sortierten, gefärbten Zellen.

#### 4.2 PCMC und BMCMC exprimieren die Thrombinrezeptoren PAR1, 3 und 4 auf mRNA Ebene

Um zu überprüfen, ob MZ PAR exprimieren wurden, da keine geeigneten kommerziellen Antikörper gegen PAR für FACS oder Western Blot zur Verfügung stehen, PCMC und BMCMC auf mRNA Ebene untersucht.

Wie in Abb. 9A und 9B ersichtlich ist, konnten sowohl in BMCMC als auch in PCMC mRNA Transkripte für PAR1, 3 und 4 mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die unterschiedlich starken Transkriptbanden der einzelnen PAR weisen auf unterschiedliche Expressionslevel hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Expressionsraten der verschiedenen mRNAs der PAR zusätzlich mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Die Analyse (Abb. 9C) zeigte jedoch, dass kein messbarer Unterschied im Expressionsniveau der verschiedenen PAR in den zwei untersuchten MZ-Typen detektierbar ist.

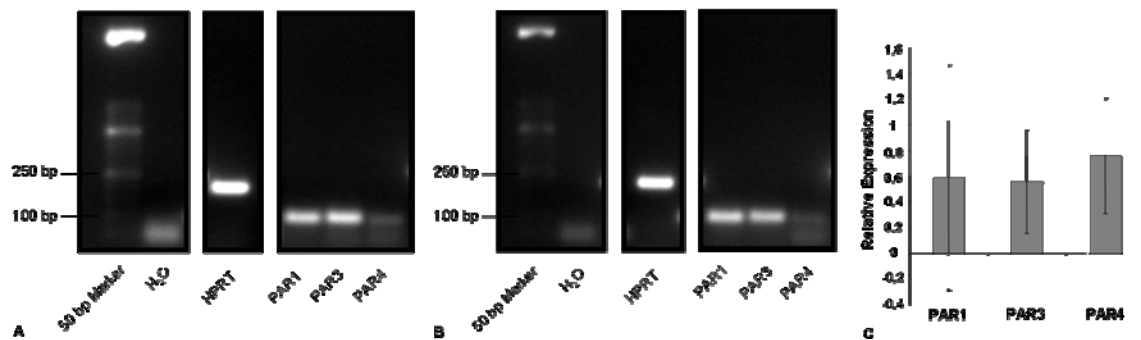


Abb. 9: BMCMC und PCMC exprimieren PAR1, 3 und 4 auf mRNA Ebene. A) BMCMC und B) PCMC. C) Relative Expression von PAR1, 3 und 4 im Vergleich von BMCMC zu PCMC, bezogen auf die BMCMC.

### 4.3 Untersuchung der Aktivierung von Mastzellen

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass MZ mRNA für alle bekannten Thrombinrezeptoren transkribieren können. Um zu prüfen, ob MZ diese PAR auf der Zelloberfläche exprimieren und dadurch auf PAR Agonisten oder Thrombin reagieren können, wurde die Degranulation und Mediatorfreisetzung von MZ nach Inkubation mit PAR aktivierenden Stimulanzen untersucht.

Als Positivkontrolle wurde jeweils eine Stimulation mit dem Kalziumionophor Ionomycin durchgeführt. Ionomycin bindet Kalzium 1:1 und transportiert es durch die Zellmembran. Dies hat eine Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Reserven zur Folge und resultiert in einer unspezifischen Degranulation der MZ. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte MZ verwendet.

#### 4.3.1 Mastzellen setzen nach Stimulation mit der PAR aktivierenden Serinprotease Thrombin $\beta$ -Hexosaminidase frei

Da nachgewiesen wurde, dass MZ PAR1, 3 und 4 exprimieren, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung einer dieser Rezeptoren zur Degranulation von MZ führt. Um dies zu überprüfen wurden die MZ mit Thrombin stimuliert. Die Verwendung des  $\beta$ -Hexosaminidase Assays zeigte, dass eine Stimulation mit Thrombin tatsächlich bei BMCMC und PCMC zu einer Degranulation führt. Zusätzlich wurden auch PMC direkt aus der Lavage ohne Aufreinigung, verwendet. Sie reagierten ebenfalls mit einer Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase nach Thrombinstimulation. Abb. 10 zeigt die Stimulation von BMCMC (Abb. 10A), PCMC (Abb. 10B) und PMC (Abb. 10C) mit Thrombin in verschiedenen Konzentrationen, 2  $\mu$ M Ionomycin als Positivkontrolle sowie die unstimulierten Zellen. Bei den BMCMC resultierte die Thrombinstimulation ab einer Konzentration von 0,5 NIH UN Thrombin in einer geringen, jedoch statistisch signifikanten Erhöhung der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung ( $5,2 \pm 2,8$  %;  $P = 0,036$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $3,1 \pm 1,1$  %). Die Verwendung von höheren Thrombinkonzentrationen (10 NIH UN,  $7,3 \pm 4,4$  %) führte zu keiner weiteren signifikanten

erhöhten Zunahme der  $\beta$ -Hexosaminidase. Die Stimulation von PCMC mit Thrombin (Abb. 10B) führte ebenfalls zu einem signifikanten sowie zusätzlich zu einem deutlichen dosisabhängigen Anstieg der Freisetzung an  $\beta$ -Hexosaminidase im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ( $4,9 \pm 2,7 \%$ ). Die Verwendung von 1 NIH UN Thrombin ( $16,9 \pm 7,8 \%$ ;  $P = 0,0016$ ) resultierte in einer signifikant erhöhten Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase. Bei einer Stimulation mit 5 oder 10 NIH UN Thrombin wurde ein Plateau erreicht, bei dem auch eine signifikant erhöhte Degranulation (5 NIH UN Thrombin  $19,6 \pm 5,9\%$ ;  $P = 0,0077$  bzw. 10 NIH UN Thrombin  $20,0 \pm 6,2 \%$ ,  $P = 0,0041$ ) vorlag. Bei PMC löste eine Stimulation mit 0,5 NIH UN Thrombin eine signifikant erhöhte Degranulation ( $29,7 \pm 7,5 \%$ ;  $P = 0,0347$ ) im Vergleich zu den unstimulierten MZ ( $14,8 \pm 2,4 \%$ ) aus. Ab einer verwendeten Konzentration von 5 NIH UN Thrombin wurde ein Plateau erreicht ( $44,8 \pm 4,4 \%$ ;  $P = 0,0003$ ). Auffällig bei den PMC war, dass die Positivkontrolle ( $36,9 \pm 16,6 \%$ ) zu einer geringeren Freisetzung im Vergleich zu den PCMC ( $55,3 \pm 9,9 \%$ ) und BMCMC ( $46,6 \pm 22,2 \%$ ) führte. Gleichzeitig war eine höhere Spontanfreisetzung bei den unstimulierten Zellen erkennbar (PMC  $14,8 \pm 2,4 \%$ , PCMC  $4,9 \pm 2,7 \%$ , BMCMC  $3,1 \pm 1,1 \%$ ). Ein Vergleich der Degranulation zwischen den BMCMC und PCMC zeigte, dass eine signifikant erhöhte Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase der PCMC ab einer Konzentration von 1 NIH UN Thrombin (1 NIH UN Thrombin  $P = 0,0004$ ; 5 NIH UN Thrombin  $P = 0,0003$ ; 10 NIH UN Thrombin  $P = 0,0018$ ) erreicht wurde. Der Unterschied in der Freisetzung zwischen den PMC und BMCMC war ab der geringsten verwendeten Thrombinkonzentration statistisch signifikant (0,05 NIH UN Thrombin  $P = 0,0017$ ; 0,1 NIH UN Thrombin  $P = 0,0058$ ; 0,5 – 10 NIH UN Thrombin  $P \leq 0,0001$ ). Ebenso führte die Stimulation mit Thrombin schon ab der geringsten verwendeten Konzentration zu einer signifikant erhöhten Freisetzung in den PMC im Vergleich zu den PCMC (0,05 NIH UN Thrombin  $P = 0,0158$ ; 0,1 NIH UN Thrombin  $P = 0,0323$ ; 0,5 NIH UN Thrombin  $P = 0,0006$ ; 1 NIH UN Thrombin  $P = 0,0047$ ; 5 und 10 NIH UN Thrombin  $P \leq 0,0001$ ). Somit wurde nachgewiesen, dass unterschiedlich differenzierte MZ durch eine Stimulation mit Thrombin verschieden stark aktiviert werden können.

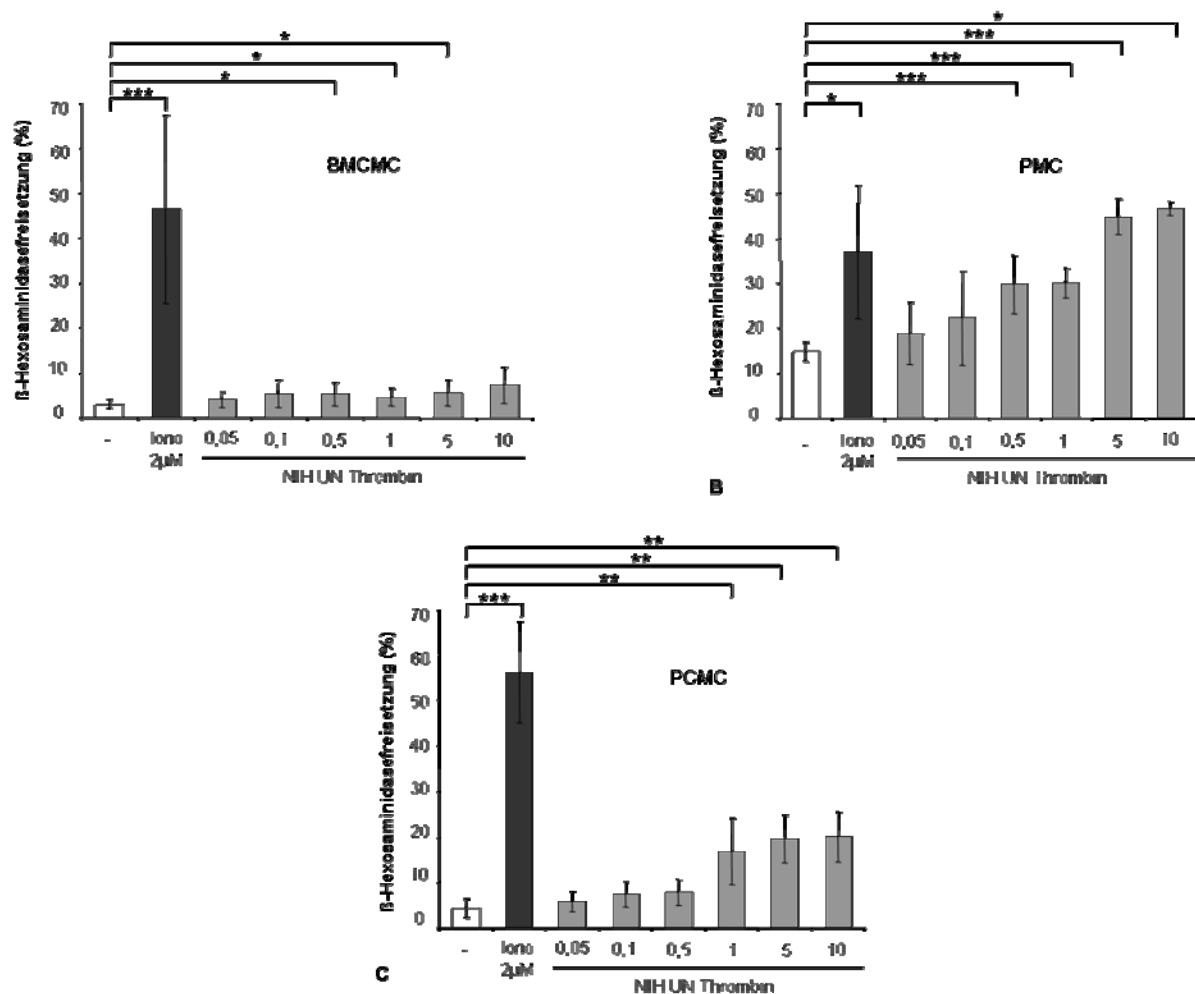


Abb. 10: MZ können nach Stimulation mit der Serinprotease Thrombin degranulieren. Messung der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung A) BMCMC, B) PMC und C) PCMC nach 30 min Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Thrombin. n = 5 - 8 unabhängige Versuche. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

#### 4.3.2 Mastzellen setzen nach Aktivierung von PAR1 oder PAR4 $\beta$ -Hexosaminidase frei

Die gezeigte Aktivierung von MZ durch Thrombin führte nun zu der Frage, welcher der drei PAR eine Degranulation der MZ auslösen kann. Da PAR3 im murinen System als Korezeptor von PAR4<sup>125</sup> fungiert, wurde die  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung nur nach Stimulation mit spezifischen PAR1- und PAR4-AP untersucht. BMCMC wiesen nach 30-minütiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des PAR1-AP keine statistisch signifikante Degranulation auf (Abb. 11A). Die höchste Konzentration des PAR1-AP,  $10^{-4}$  M, löste keine erhöhte Degranulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen aus ( $5,1 \pm 3,6$  % gegen  $3 \pm 1,1$  %). Die Stimulation von PMC (Abb. 11B) mit den PAR1-AP führte nur bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  M zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung ( $29,9 \pm 5,2$  %;  $P = 0,007$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle ( $14,8 \pm 2,4$  %). Eine 30-minütige Stimulation von PCMC mit unterschiedlichen Konzentrationen des PAR1-AP (Abb. 11C) zeigte dosisabhängig eine Zunahme der Degranulation im Vergleich zur Negativkontrolle ( $4,9 \pm 2,7$

%). Ab einer Konzentration von  $10^{-5}$  M wurde eine signifikant erhöhte Freisetzung ( $9,9 \pm 6,6$  %;  $P = 0,013$ ) ermittelt. Die maximale Freisetzung wurde bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M ( $34,0 \pm 18,9$  %;  $P \leq 0,0001$ ) erreicht. Die Erhöhung der Konzentration auf  $10^{-3}$  M führte zu keiner weiteren Steigerung der Freisetzung ( $21,7 \pm 16,3$  %;  $P = 0,07$ ). Im Vergleich dazu resultierte eine Stimulation von PCMC mit dem PAR4-AP insgesamt in einer geringeren Freisetzung (Abb. 11D). Ausschließlich die Stimulation mit einer Konzentration von  $10^{-3}$  M führte zu einer signifikant erhöhten Freisetzung ( $27,9 \pm 14,3$  %;  $P = 0,004$ ) im Vergleich zur Vehikelkontrolle ( $3,8 \pm 0,9$  %). Jede weitere verwendete Konzentration an PAR4-AP löste eine schwache Freisetzung aus, vergleichbar mit den unstimulierten Zellen.

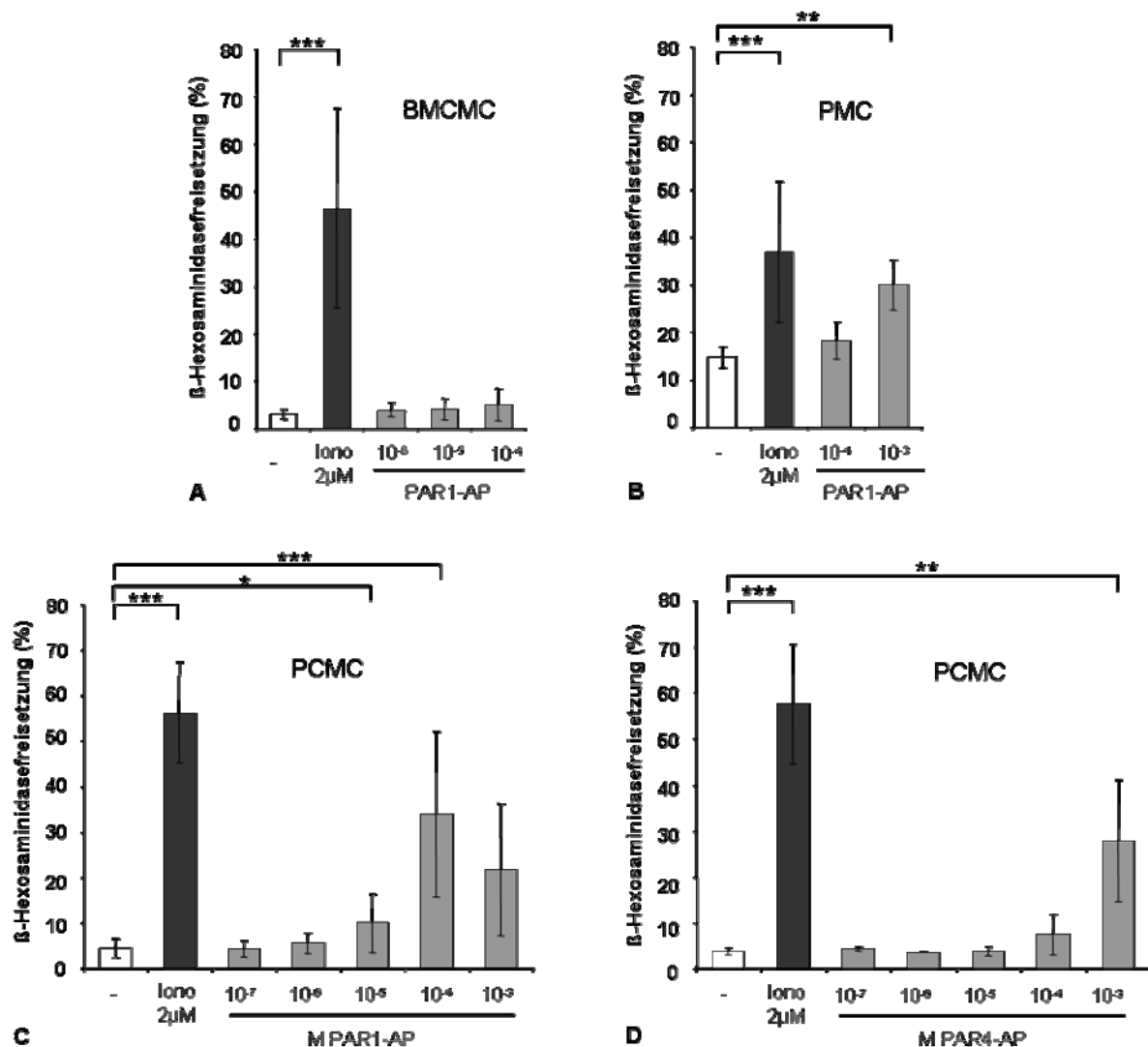


Abb. 11: MZ können nach Stimulation mit einem PAR1 oder PAR4 Agonisten degranulieren. Messung der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung von A) BMCMC und B) PMC nach 30 min Stimulation mit dem PAR1 agonistischen Peptid, C) PCMC Stimulation mit dem PAR1 und D) mit dem PAR4 agonistischen Peptid.  $n = 5 - 15$  unabhängige Versuche. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

Die präsentierten Ergebnisse zeigten, dass MZ sowohl über PAR1 als auch über PAR4 aktiviert werden können.

#### 4.3.3 Mastzellen setzen nach Inkubation mit PAR antagonistischen Peptiden und einem chemischen Antagonisten $\beta$ -Hexosaminidase frei

Aus den bisherigen Untersuchungen ist ersichtlich, dass PCMC durch Thrombin über mindestens zwei verschiedene PAR aktiviert werden können. Es stellte sich die Frage, welcher PAR für die Aktivierung von MZ durch Thrombin relevant ist. Um dies zu überprüfen, wurden ausschließlich PCMC mit verschiedenen Antagonisten inkubiert die später zusammen mit Thrombin für die Inkubation mit MZ genutzt werden sollten. Die Inkubation von PCMC sowohl mit dem PAR1-AtP (Abb. 12A) als auch mit dem PAR4-AtP (Abb. 12B) sowie mit dem chemischen PAR1 Antagonisten SCH79797 (12C) führte jedoch zu einer erhöhten dosisabhängigen Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase.

Das PAR1-AtP führte zu einer signifikant erhöhten  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von  $10^{-3}$  M ( $46,3 \pm 3,9$  %;  $P = 0,0001$ ) bis einschließlich  $10^{-8}$  M ( $23,8 \pm 15,0$  %;  $P = 0,0117$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $3,8 \pm 0,9$  %). Die Inkubation mit dem chemischen Antagonisten SCH79797 in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung ( $46,99 \pm 16,74$  %;  $P = 0,0041$ ) ähnlich der Positivkontrolle ( $48,5 \pm 20,1$  %). Mit Abnahme der Konzentration des chemischen Antagonisten verringerte sich auch die Degranulation. Ab  $10^{-6}$  M war die Freisetzung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $3,8 \pm 0,9$  %) nicht mehr signifikant erhöht ( $12,3 \pm 8,6$  %;  $P = 0,06$ ). Auch das PAR4-AtP führte zu einer signifikant erhöhten Degranulation, mit einem Maximum bei der höchsten verwendeten Konzentration von  $10^{-3}$  M ( $41,4 \pm 5,5$  %;  $P = 0,0001$ ). Ähnlich dem SCH79797 führte auch hier die Verringerung der Konzentration zu einer Verminderung der Degranulation. Eine Konzentration von  $10^{-7}$  M löste noch eine signifikant ( $9,304 \pm 5,734$  %;  $P = 0,04$ ) erhöhte Freisetzung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen aus ( $3,789 \pm 0,906$  %). Aufgrund dieser hohen Freisetzung, ausgelöst durch die Behandlung der MZ mit den verschiedenen PAR Antagonisten, konnte eine PAR-spezifische Inhibierung der Thrombin-vermittelten MZ-Reaktion nicht untersucht werden.



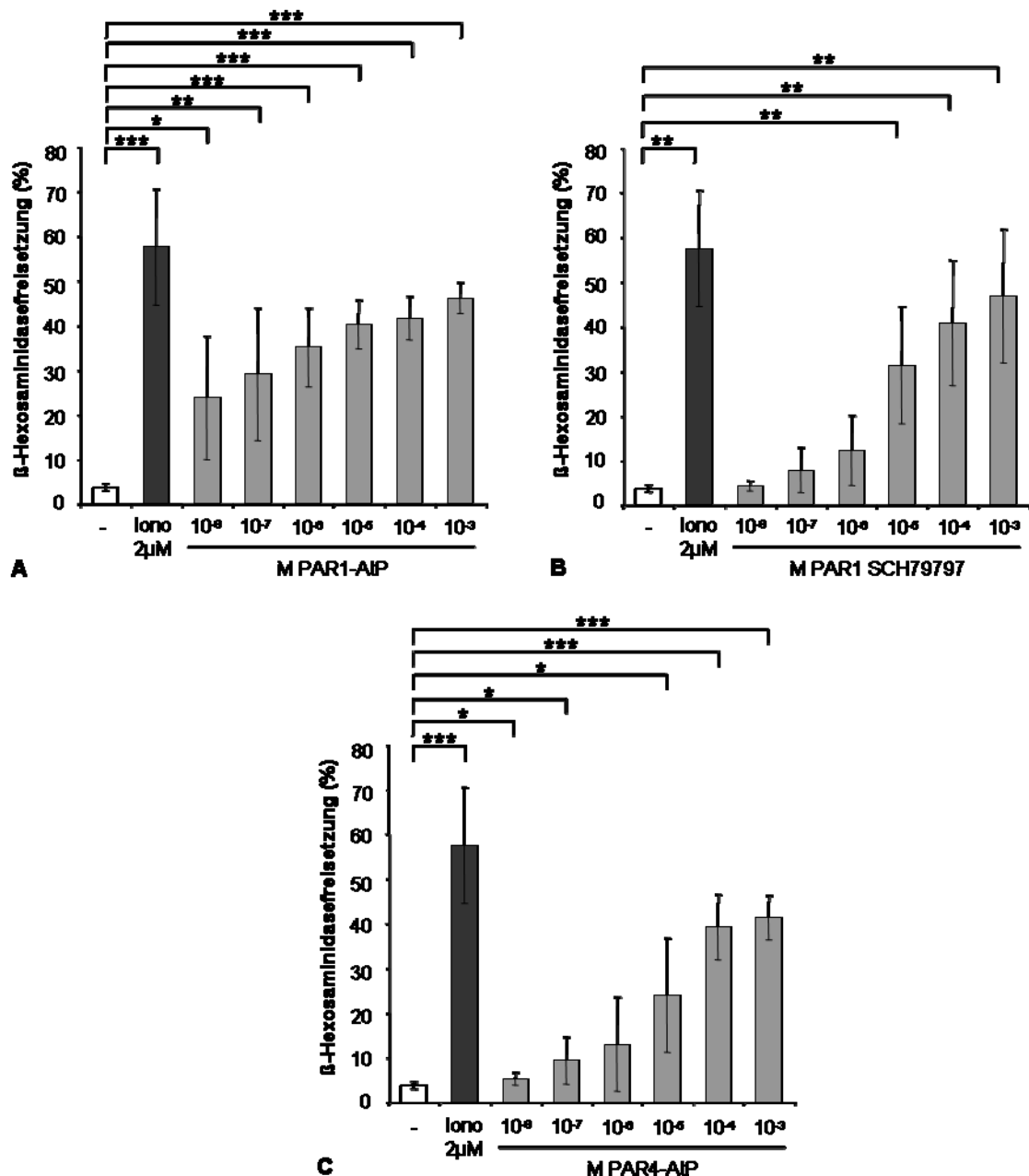


Abb. 12: MZ zeigen nach Inkubation mit PAR Antagonisten Degranulation. Messung der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung von PCMCs nach 30 min Inkubation mit A) dem PAR1-AIP oder B) dem chemischen PAR1 Antagonisten SCH79797 oder C) mit dem PAR4-AIP. n = 4 – 7 unabhängige Versuche. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

#### 4.3.4 Thrombin induziert Histaminfreisetzung

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung wird ersichtlich, dass Mastzellen über verschiedene PAR aktiviert werden können. Die Analyse der Freisetzung von Histamin durch PCMC nach Stimulation mit Thrombin bestätigte dies (Abb. 13). Eine einstündige Stimulation von PCMC mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin (Abb. 13A) oder PAR1-AP (Abb. 13B) zeigte eine Dosis-abhängige Freisetzung von Histamin, wobei die Stimulation mit 10 NIH UN Thrombin in der höchsten Freisetzung

von Histamin ( $108,3 \pm 9,4$  ng/ml;  $P = 0,004$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $35,4 \pm 6,3$  ng/ml) resultierte. Ebenso führte die Verwendung von  $10^{-4}$  M PAR1-AP zur stärksten Freisetzung von Histamin ( $117,0 \pm 53,4$  ng/ml;  $P = 0,1$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ( $35,4 \pm 6,3$  ng/ml), allerdings war dieser Unterschied, am ehesten durch die hohe Variabilität des Effekts, nicht statistisch signifikant. Diese Ergebnisse untermauern die Aussage, dass die Stimulierung von MZ mit Thrombin zu einer Degranulation führt.

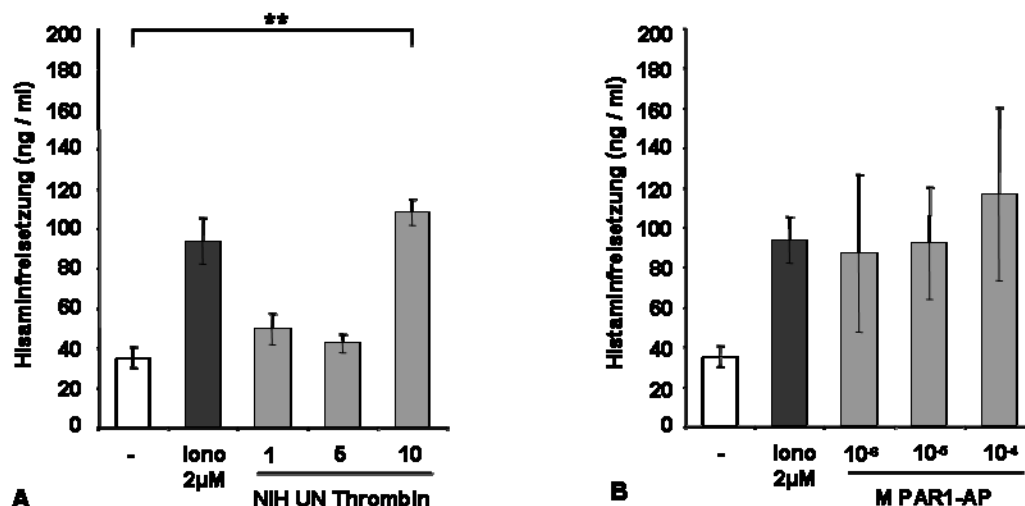


Abb. 13: MZ setzen nach Stimulation mit Thrombin jedoch nicht nach Stimulation mit dem PAR1-AP Histamin frei. Messung der Histaminfreisetzung von PCMC nach 1h Stimulation mit A) Thrombin und B) dem PAR1-AP. drei unabhängige Experimente. , \*\*  $P \leq 0,01$ .

#### 4.4 Thrombin führt nicht zu einer signifikanten Freisetzung von MCP-1 bei Mastzellen

Der Nachweis der Degranulation von MZ nach Stimulation mit Thrombin oder dem PAR1-AP führte zu der Frage, ob nachfolgend auch de novo synthetisierte proinflammatorische Mediatoren von MZ freigesetzt werden können. Untersucht wurde deshalb die Freisetzung des Zytokins TNF und des Chemokins MCP-1 (Abb. 14 A). Die Stimulation mit Thrombin führte zu keiner messbaren Freisetzung von TNF und resultierte in keiner signifikant veränderten Freisetzung von MCP-1. Ebenso führte die Stimulation mit dem PAR1-AP zu keiner detektierbaren Freisetzung von TNF und zu keiner signifikant veränderten Freisetzung von MCP-1. Ein Vergleich der unstimulierten Zellen und der Positivkontrolle zeigte für die MCP-1 Freisetzung einen Anstieg der Konzentration, der jedoch nicht signifikant verschieden war. Auffällig ist die Zunahme der MCP-1 Konzentration nach der Stimulation mit dem PAR1-AP nach 1 h. Hier ist ein Trend zu erkennen, der aufgrund der hohen Schwankungen innerhalb der Versuche nicht signifikant ist. Nach 24 h zeigt sich ein anderes Bild. Die Stimulation mit dem PAR1-AP führe zu einer dosisabhängigen Abnahme der Konzentration für MCP-1. Auch hier war aufgrund der hohen Variabilitäten innerhalb der einzelnen Versuche keine Signifikanz nachweisbar.

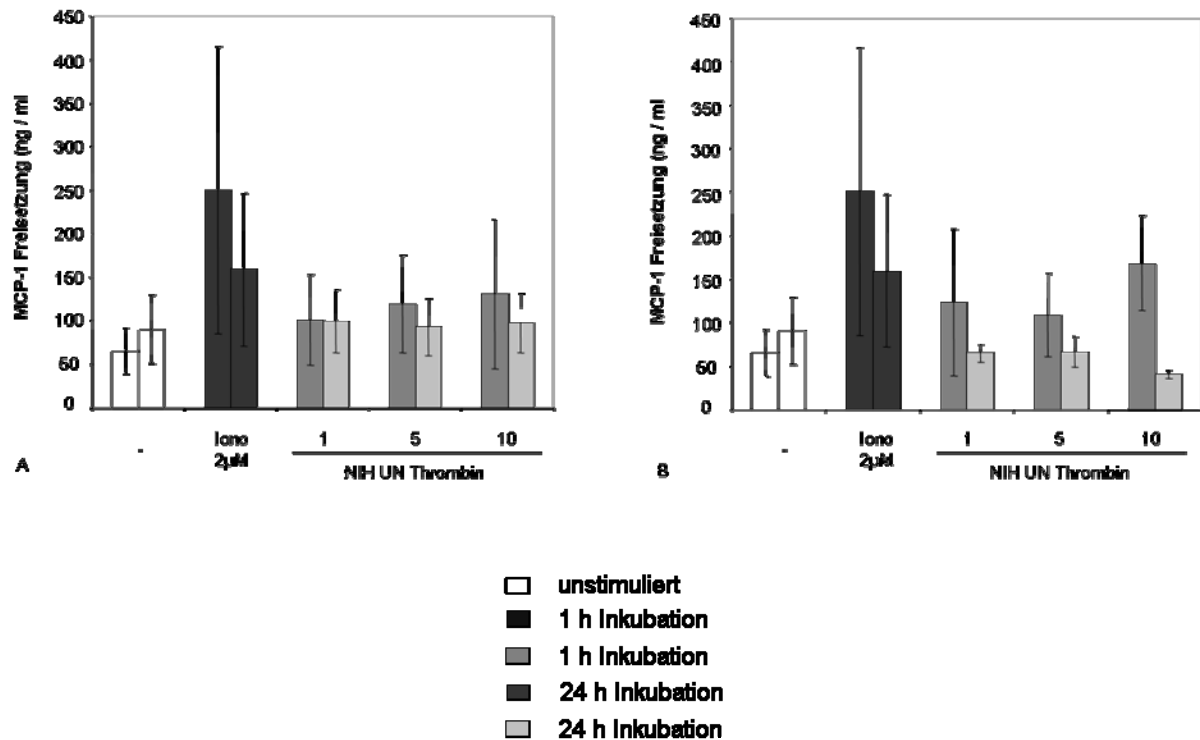


Abb. 14: Thrombin führt nicht zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von MCP-1. Analyse der Freisetzung von MCP-1 nach Stimulation mit A) Thrombin oder B) dem PAR1-AP. Drei unabhängige Versuche.

#### 4.5 Eine Injektion von Thrombin in das murine Ohr löst eine sofortige Ohrschwellung aus

Mit dem Ziel, die *in vivo* Relevanz einer Aktivierung von MZ über PAR zu untersuchen, wurde MZ-kompetenten C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäusen Thrombin intradermal in das Ohr injiziert. Löst die induzierte Reaktion eine Zunahme der Ohrdicke aus, weist dies auf eine Entzündungsreaktion hin<sup>164, 166</sup>. Um den Einfluss von MZ auf die Thrombin-induzierte kutane Entzündung zu untersuchen, wurden nachfolgend MZ-defiziente C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse verwendet. Die Dokumentation der gemessenen Ohrdicken und die anschließende Berechnung der Ohrschwellung illustrieren den Effekt von Thrombin im Vergleich zur Vehikelkontrolle bezogen auf die Basisohrdicke.

##### 4.5.1 Thrombin führt dosisabhängig zu einer Hautentzündungsreaktion

Um eine erste Aussage über mögliche proinflammatorische Effekte von Thrombin und PARs auf MZ *in vivo* treffen zu können, wurden für die Injektion von Thrombin in C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäuse 3 verschiedene Konzentrationen Thrombin verwendet und die Ohrdicke zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Wie in Abb. 15 ersichtlich ist, induzierte die Injektion von Thrombin in das Mausohr unabhängig von der verwendeten Konzentration eine sofortige und signifikante Ohrschwellung. Jede der 3 verwendeten Thrombinkonzentrationen, 10 NIH UN, 7 NIH UN, 4 NIH UN, führte zu einer

signifikant erhöhten Ohrschwellung mit sehr ähnlicher Kinetik im Vergleich zur Vehikelkontrolle (10 NIH UN gegen Vehikel  $P \leq 0,0001$ ; 7 NIH UN gegen Vehikel  $P \leq 0,0001$ ; 4 NIH UN gegen Vehikel  $P \leq 0,0001$ ). Der Vergleich der 3 Ohrschwellungskurven über den gesamten Zeitraum nach Thrombinbehandlung untereinander ergab folgende signifikante Veränderungen: 10 NIH UN Thrombin versus 7 NIH UN Thrombin  $P = 0,04$ ; 10 NIH UN Thrombin versus 4 NIH UN Thrombin  $P \leq 0,0001$ ; 7 NIH UN Thrombin versus 4 NIH UN Thrombin  $P \leq 0,0001$ .

Die höchste Ohrdicke nach Thrombinbehandlung wurde nach 1 h gemessen (10 NIH UN  $128,4 \pm 30,1 \mu\text{m}$ , 7 NIH UN  $114,7 \pm 22,4 \mu\text{m}$ , 4 NIH UN  $92,3 \pm 24,5 \mu\text{m}$ ). Die Vehikelbehandlung löste zu diesem Zeitpunkt lediglich eine geringe Schwellung aus ( $29,8 \pm 8,7 \mu\text{m}$ ,  $26,5 \pm 16,5 \mu\text{m}$ ,  $21,9 \pm 21,1 \mu\text{m}$ ). Ein Vergleich der Ohrschwellungsstärke nach 1 h für 10 NIH UN mit 4 NIH UN ergab einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0124$ ). Im Verlauf der Zeit wurde eine kontinuierliche Abnahme der Ohrschwellung mit einem Plateau von 2 bis 6 h in den Thrombin-behandelten Ohren gemessen. Nach 6 h war noch immer eine dosisabhängige Ohrschwellung messbar (10 NIH UN  $79,4 \pm 14,3 \mu\text{m}$ , 7 NIH UN  $73,0 \pm 13,0 \mu\text{m}$ , 4 NIH UN  $45,0 \pm 12,2 \mu\text{m}$ ). Eine Spätreaktion konnte nicht nachgewiesen werden, da nach 24 h (10 NIH UN  $52,0 \pm 19,0 \mu\text{m}$ , 7 NIH UN  $59,4 \pm 23,9 \mu\text{m}$ , 4 NIH UN  $43,3 \pm 10,4 \mu\text{m}$ ) und nach 48 h (10 NIH UN  $33,3 \pm 11,6 \mu\text{m}$ , 7 NIH UN  $41,1 \pm 19,5 \mu\text{m}$ , 4 NIH UN  $21,6 \pm 11,4 \mu\text{m}$ ) eine kontinuierliche Abnahme der Ohrdicke gemessen wurde. Nach 72 h war die Ohrdicke annähernd auf den Basiswert (vor der Injektion) zurückgegangen (10 NIH UN  $26,5 \pm 3,1 \mu\text{m}$ , 7 NIH UN  $34,4 \pm 16,3 \mu\text{m}$ , 4 NIH UN  $17,5 \pm 4,5 \mu\text{m}$ ). Für die anschließenden Untersuchungen wurde die Verwendung von 7 NIH UN Thrombin gewählt, da dies die weitere Untersuchung inhibierender oder synergistischer Effekte erlaubt. Die Bestimmung der Ohrdicke wurde auf den Zeitraum von 6 h nach Injektion begrenzt, da keine Spätreaktion induziert wurde.

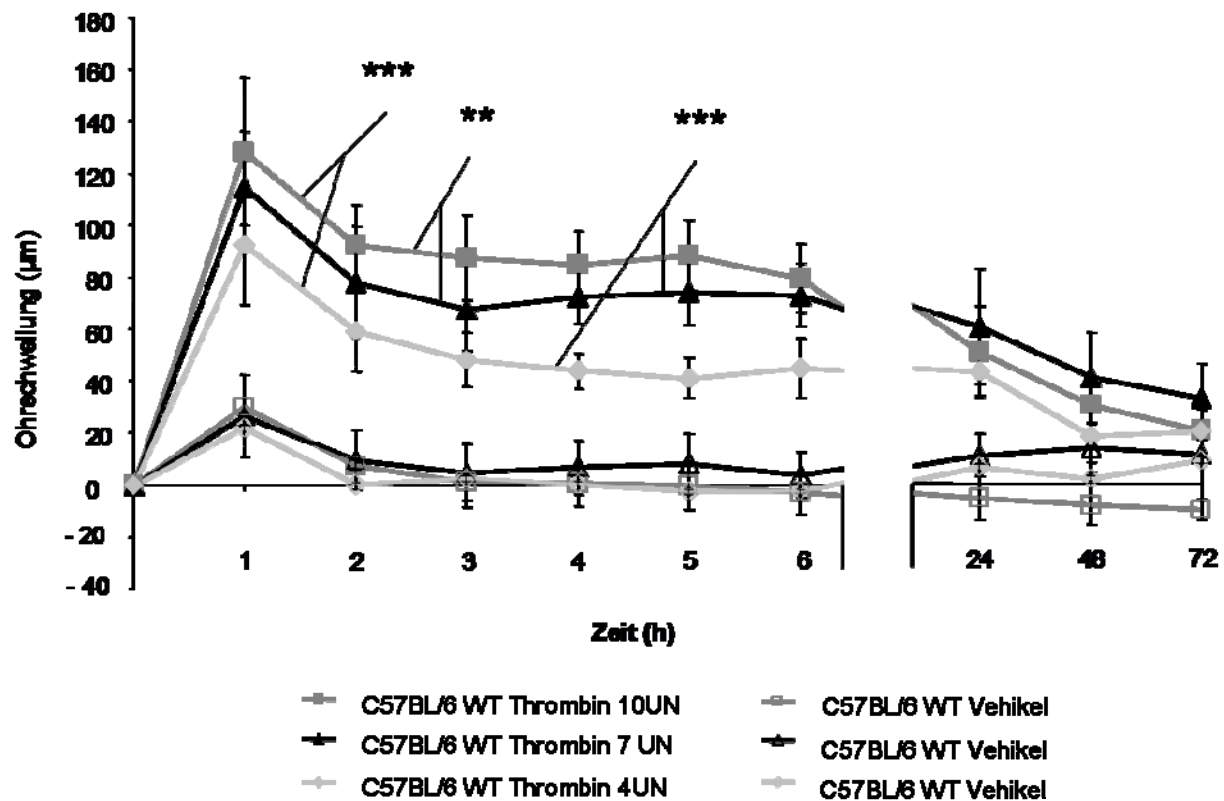


Abb. 15: Eine Thrombininjektion induziert eine Hautentzündungsreaktion, Darstellung der Ohrschwellung nach Thrombininjektion. Die Kurven mit den gefüllten Symbolen zeigen die Thrombinbehandlung, die dunkelgraue Kurve zeigt die Ohrschwellung für 10 NIH UN, die schwarze für 7 NIH UN und die hellgraue für 4 NIH UN. Die Kurven mit den nicht gefüllten Symbolen sind die jeweils entsprechenden Vehikelkontrollen. Pro Gruppe  $n = 3 - 10$ , drei unabhängige Experimente \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

Abb. 16 zeigt exemplarisch Haemalaun-Eosin-Färbungen von Schnitten der Ohrbiopsien in 200facher Vergrößerung. Dargestellt sind Präparate von Mausohren, die mit 4 (Abb. 16B), 7 (Abb. 16D) oder 10 (Abb. 16F) NIH UN Thrombin behandelt wurden, im Vergleich zu den jeweiligen Vehikel-behandelten Ohren (Abb. 16A, C, E). Um eine gute Übersicht über das Präparat zu erhalten wurde die Haemalaun-Eosin-Färbung genutzt. Die histologischen Präparate zeigten, dass alle verwendeten Thrombinkonzentration eine deutliche Zunahme der Ohrdicke ausgelöst haben im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ohren, welche keine Vergrößerung der Ohrdicke aufwiesen. Zusätzlich ist ein deutlicher Einstrom von granulären Leukozyten in den Thrombin-behandelten Ohren erkennbar (rote Pfeile).



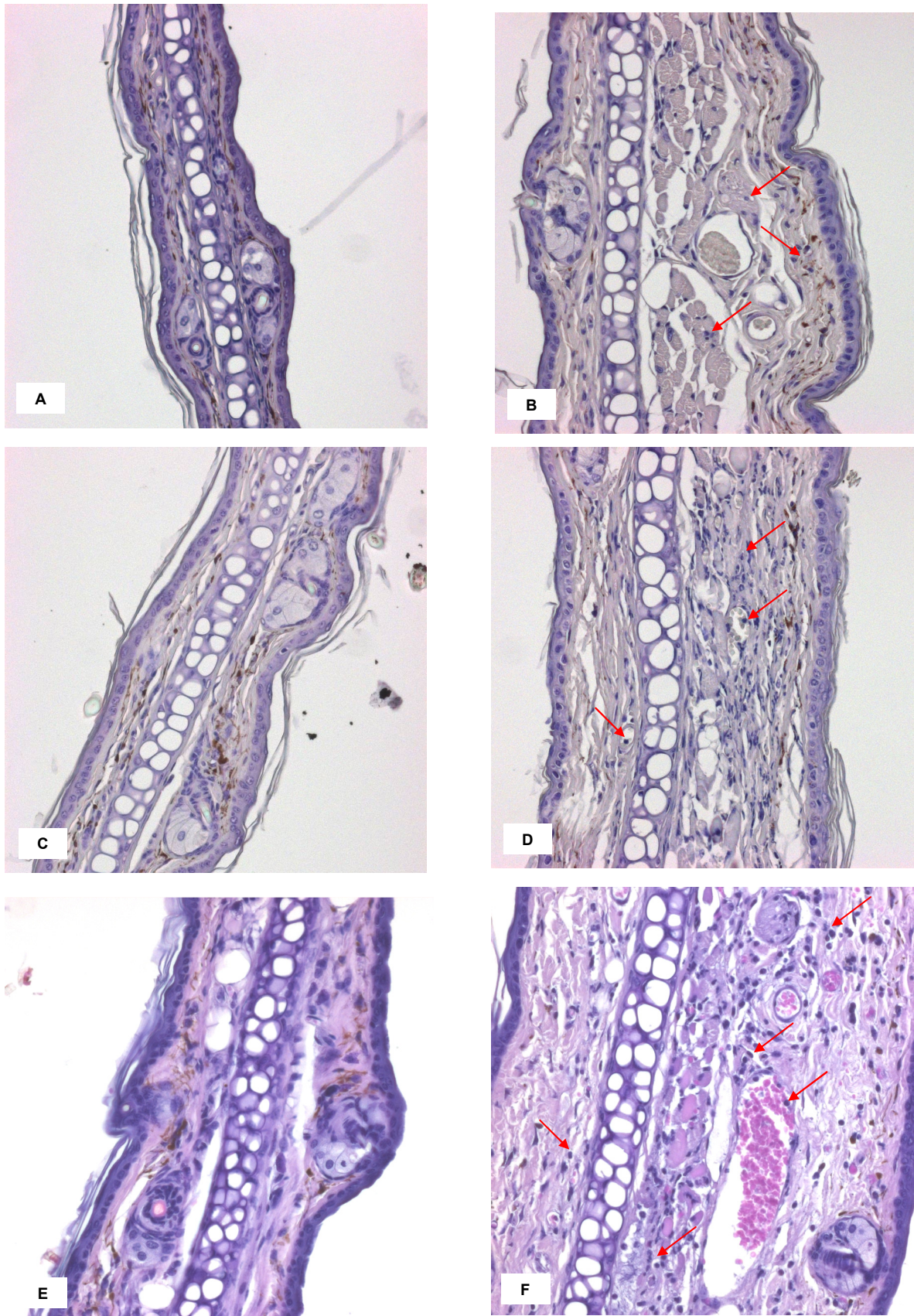


Abb.16: Thrombin führt zu einer Hautentzündung. Histologische Übersicht von Ohrschnitten nach Haemalaun-Eosin-Färbung 200 fach vergrößert. A), C) und E) zeigen Vehikel-behandelten Ohren nach 6 h. B), D) und F) zeigen Thrombin-behandelten Ohren nach 6 h. (B) 4, D) 7 und F) 10 NIH UN Thrombin). Die roten Pfeile markieren Granulozyten.

#### 4.5.2 Mastzellen kontrollieren die Thrombin-induzierte Hautentzündungsreaktion

Um die Rolle der MZ bei durch Thrombin ausgelösten kutanen Entzündungsreaktionen zu untersuchen, wurden MZ-kompetente C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>*, Mastzell-defiziente C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* sowie erfolgreich lokal rekonstituierte C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäuse untersucht. Abb. 17 zeigt, dass die Injektion von 7 NIH UN Thrombin in C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen eine signifikante Ohrschwellung im Vergleich zum Vehikel-behandelten Ohr auslöste ( $P \leq 0,0001$ ). Die höchste Ohrschwellung nach Thrombinbehandlung wurde nach 1 h gemessen ( $131,9 \pm 29,2 \mu\text{m}$ ). Im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ohren war sie signifikant erhöht ( $30,3 \pm 19,2 \mu\text{m}$ ;  $P \leq 0,0001$ ). Im zeitlichen Verlauf nahm die Ohrschwellung kontinuierlich ab. Nach 6 h lag sie bei den Thrombin-behandelten Ohren bei  $56,7 \pm 14,0 \mu\text{m}$ , bei den Vehikel-behandelten Ohren bei  $-2,3 \pm 6,4 \mu\text{m}$ . In MZ-defizienten Mäusen führte die Thrombinbehandlung ebenso zu einer signifikant erhöhten Ohrschwellung in der untersuchten Zeitspanne im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ohren ( $P \leq 0,0001$ ). Auch hier wurde das Maximum nach 1 h gemessen: Thrombin-behandelt ( $184,3 \pm 24,6 \mu\text{m}$ ) gegen Vehikel-behandelt ( $13,1 \pm 9,0 \mu\text{m}$ ) ( $P \leq 0,0001$ ). Über einen Zeitraum von weiteren 5 h nahm die Ohrschwellung stetig ab. Nach 6 h lag die Ohrschwellung nach Thrombinbehandlung bei  $92,8 \pm 32,2 \mu\text{m}$ , nach Vehikelbehandlung bei  $-1,4 \pm 7,0 \mu\text{m}$ . Die Vergleichsanalyse der Ohrschwellungskurven von MZ-kompetenten Mäusen und MZ-defizienten Mäusen zeigte eine signifikant erhöhte Ohrschwellung in den MZ-defizienten Mäusen ( $P = <0,0001$ ) im Untersuchungszeitraum. Die Untersuchung des 1 h-Wertes nach Thrombinbehandlung der C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen zeigte ebenfalls eine signifikant erhöhte Ohrschwellung ( $P = <0,0001$ ) in den MZ-defizienten Mäusen (Abb. 17).

Um nachzuweisen, dass eine MZ-Abhängigkeit vorliegt, wurde in MZ-defizienten Mäusen die lokale MZ-Population im Ohr durch Rekonstitution wiederhergestellt. Die Behandlung der lokal rekonstituierten C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* mit Thrombin führte ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Ohrschwellungskurve im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ohren ( $P = <0,0001$ ). Der 1 h-Wert zeigte eine signifikante Erhöhung: Vehikel-behandelt ( $36,5 \pm 24,0 \mu\text{m}$ ) versus Thrombin-behandelt ( $157,7 \pm 46,4 \mu\text{m}$ ) ( $P = <0,0001$ ). Wie in Abb. 17 zu erkennen, zeigten MZ-rekonstituierte Tiere eine Ohrschwellung, die bezogen auf ihre Intensität, zwischen der Schwellungskurve der C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäuse und der C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäuse liegt. Sie war signifikant erhöht im Vergleich zu den C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen ( $P \leq 0,0001$ ) und signifikant erniedrigt im Vergleich zu den C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Tieren ( $P \leq 0,0001$ ). Ein Vergleich des 1 h-Wertes zeigte, dass kein signifikanter Unterschied in der Ohrschwellung zwischen den MZ-kompetenten Mäusen und den rekonstituierten Mäusen vorlag ( $P = 0,1$ ).

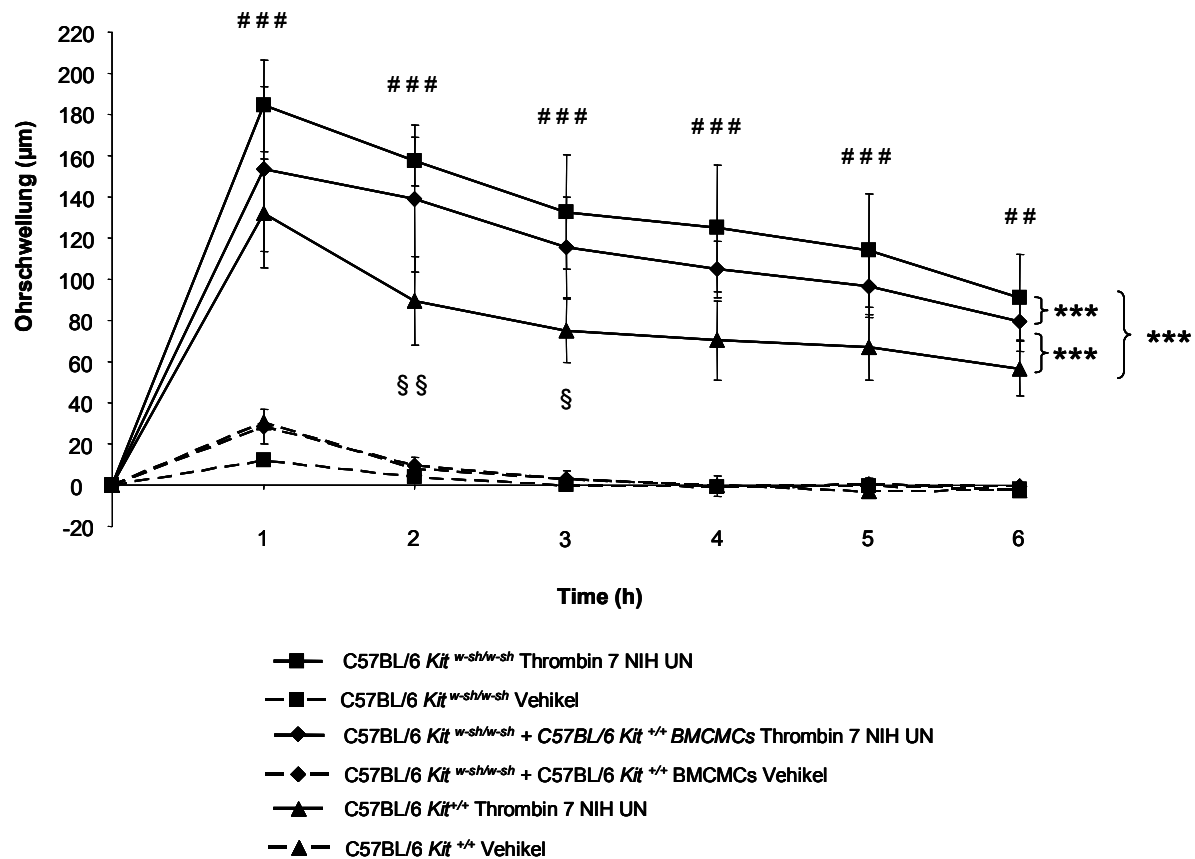


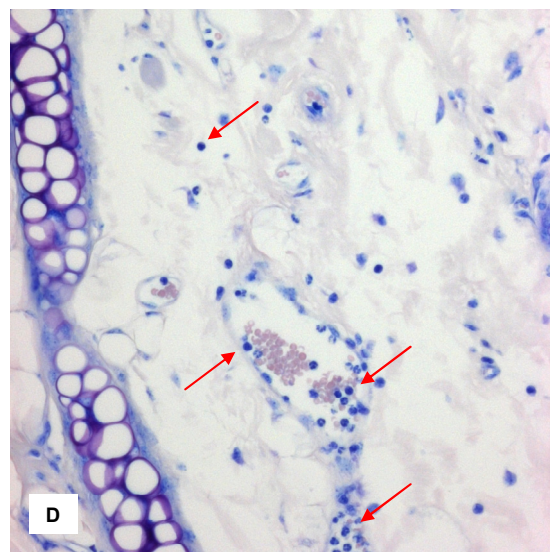
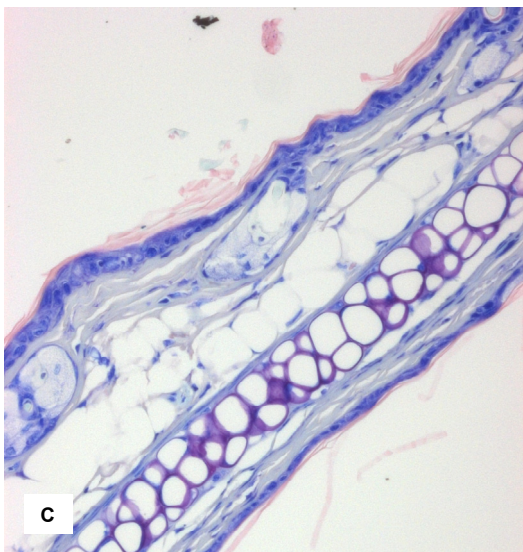
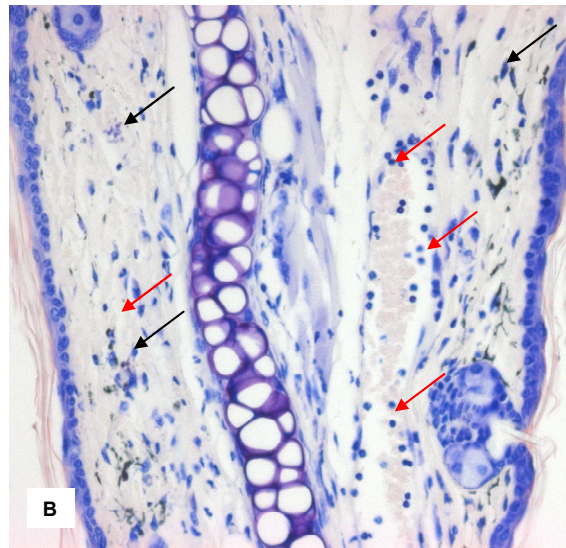
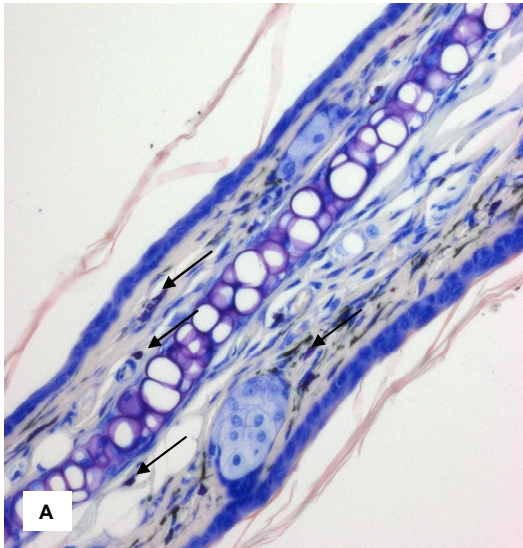
Abb. 17. MZ tragen zur Kontrolle von Thrombin-induzierten Hautentzündungsreaktionen bei, Darstellung der Ohrschwellung nach Thrombininjektion. Die schwarze Kurve mit den quadratischen Symbolen zeigt die Ohrschwellung für C57BL/6 *Kit*<sup>w-sh/w-sh</sup> Mäuse, die schwarze Kurve mit den Rauten zeigt die erfolgreich rekonstituierten C57BL/6 *Kit*<sup>w-sh/w-sh</sup> Mäuse und die schwarze Kurve mit den Dreiecken zeigt die C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäuse. Die Kurven mit der gestrichelten Linie und den gleichen Symbolen ist die jeweils entsprechende Vehikelkontrolle. Pro Gruppe n = 3-7, drei unabhängige Experimente. \* Kurvenvergleich; # MZ-defizient gegen WT; § rekonstituiert gegen WT. \*\*\* P ≤ 0,001; ## P ≤ 0,01, ### P ≤ 0,001; § ≤ 0,05, §§ P ≤ 0,01

#### 4.5.3 Thrombin führt *in vivo* zu einer Degranulation von Mastzellen

Die in Abb. 18 dargestellten Fotografien zeigen Giemsa gefärbte Schnitte der Ohrbiopsien. Die Thrombinbehandlung führte in den C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäusen (Abb. 18B) sowie in den MZ-rekonstituierten C57BL/6 *Kit*<sup>w-sh/w-sh</sup> Mäusen (Abb. 18F) zu einer Veränderung der Morphologie der MZ (schwarze Pfeile), insbesondere der Granula. Diese Granula liegen nicht dicht gepackt vor und sind deutlich heller gefärbt. Die Zellstruktur per se ist aufgelockert, die MZ sind schwer zu identifizieren, was auf eine Degranulation hinweist. Zusätzlich löste die Thrombinbehandlung in allen verwendeten Mäusen eine Zunahme der Ohrdicke sowie einen Einstrom von granulären Leukozyten (rote Pfeile) aus. In den Vehikel-behandelten Ohren (Abb. 18 A und E) weisen die MZ eine kompakte Struktur auf, die Granula sind dunkelviolettfärbt. Es war keine Veränderung der Morphologie evident. In den Schnitten von Ohren von C57BL/6 *Kit*<sup>w-sh/w-sh</sup> Mäusen (Abb. 18C und D) waren keine MZ nachweisbar. Bei den Thrombin-behandelten Ohren (Abb. 18D) waren ein prägnanter



Einstrom von granulären Leukozyten sowie eine starke Zunahme der Ohrdicke erkennbar. Die Vehikel-behandelten (Abb. 18C) Ohren zeigten auch hier keine morphologische Veränderung. Zusammenfassend ergeben diese Untersuchungen, dass eine Thrombinbehandlung zu einer Veränderung der MZ-Morphologie führt, insbesondere zu einer Veränderung der MZ-Granula, was für eine Degranulation charakteristisch ist.



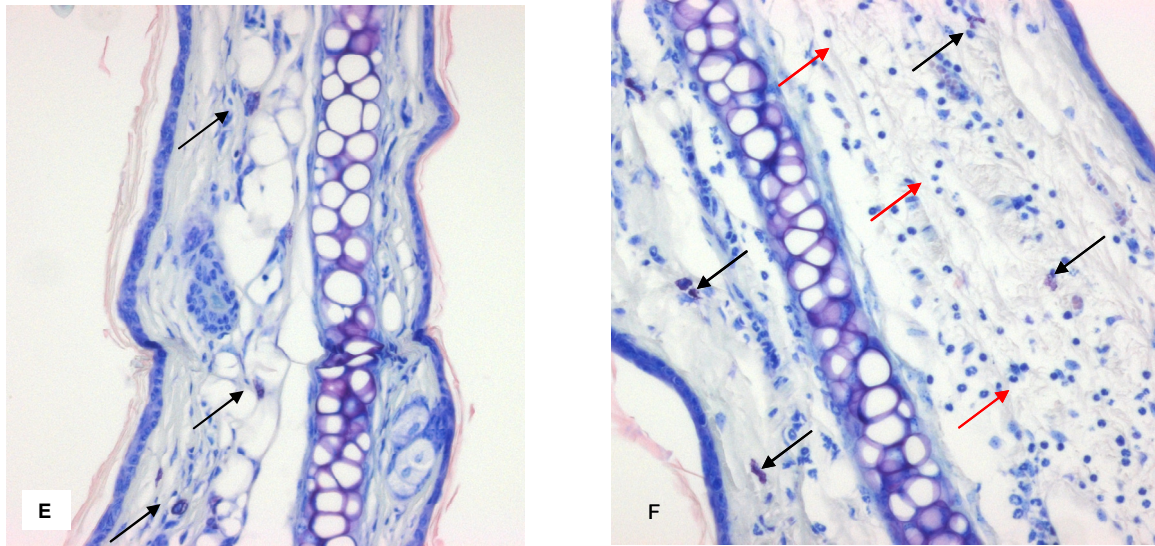


Abb. 18: Die Thrombin-induzierte Hautentzündung wird durch MZ kontrolliert. Histologische Übersicht von Ohrschnitten nach Giemsa-Färbung. (A), (C) und (E) 6 h nach Vehikelbehandlung; (B), (D) und (F) 6 h nach Thrombinbehandlung (7 NIH UN) von C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen (A und B), von C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen (C und D), sowie von erfolgreich rekonstituierten C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen (E und F) in einer 200fachen Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile weisen auf die MZ hin, die roten Pfeile auf einströmende Granulozyten.

Wie schon in Abb. 18 gezeigt, führte eine Thrombinbehandlung zu einer Veränderung der MZ-Struktur sowie der MZ-Granula. Um eine eindeutige Aussage über den Aktivitätszustand der Mastzellen treffen zu können, wurden Semidünnschnitte von Ohren von C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen angefertigt, mit alkaliner Giemsa Lösung gefärbt und anschließend histologisch bei einer 1000fachen Vergrößerung begutachtet. Zur Klassifizierung des Aktivitätszustands der MZ (schwarzer Pfeil) wurden sie anhand der Degranulation in drei Stadien unterteilt: nicht (Abb. 19A), moderat (Abb. 19B) sowie stark degranuliert (Abb. 19C).



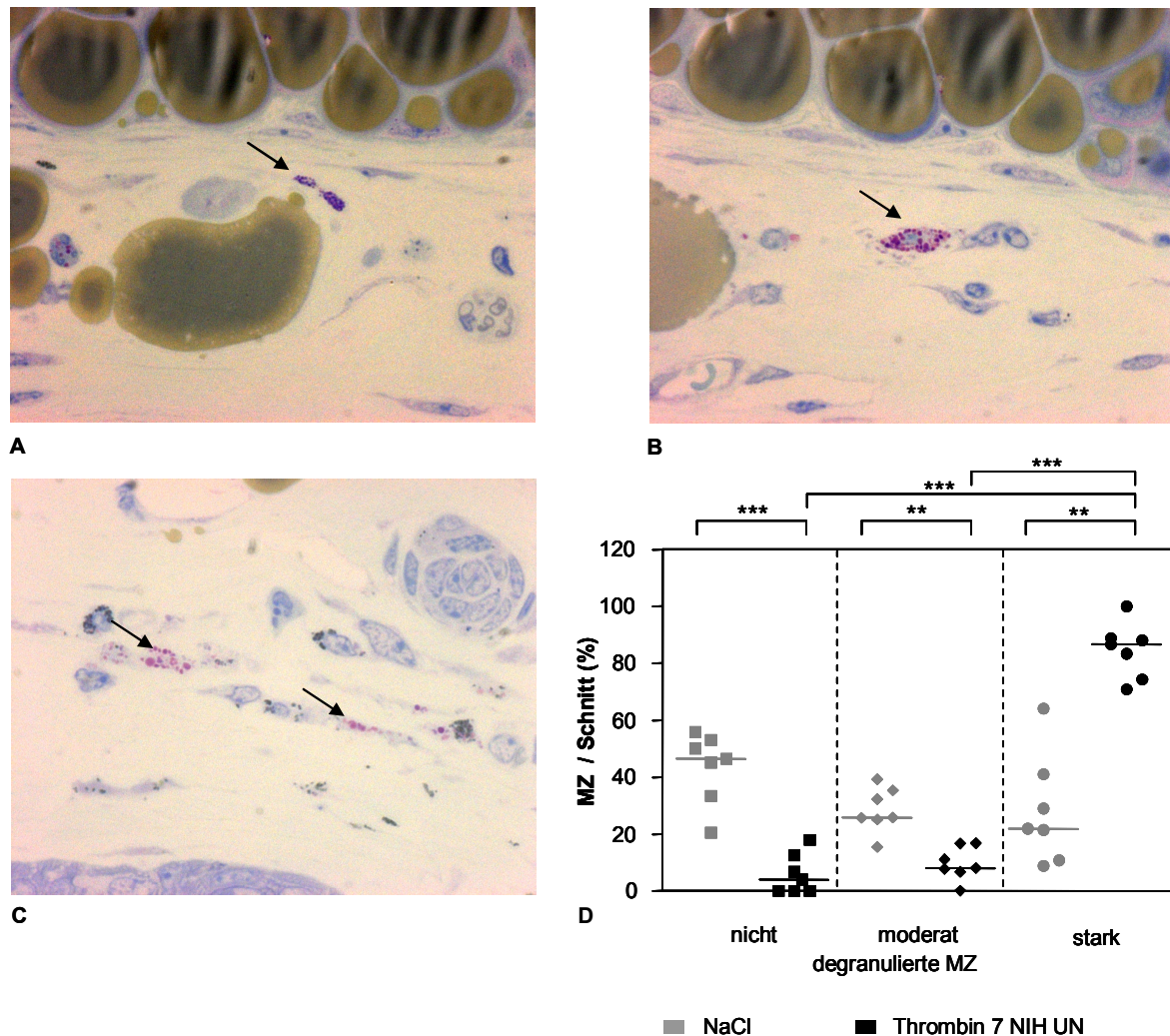


Abb. 19: Thrombin führt zu einer MZ-Degranulation *in vivo*. Darstellung verschiedener Stadien der Degranulation von MZ nach Thrombinbehandlung exemplarisch von einer Thrombin behandelten Maus. Die schwarzen Pfeile weisen auf die Mastzelle im jeweiligen Degranulationsstadium hin. A) nicht, B) moderat und C) stark degranuliert. D) Prozentualer Anteil an nicht, moderat oder stark degranulierten Mastzellen. n = 7 aus zwei unabhängigen Experimenten. \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

Deutliche Zeichen einer Aktivierung sind beispielsweise die Verschmelzung der Vesikel miteinander sowie die Änderung der Färbung der Granula von dunkelviolet zu rosa, was auf eine pH-Wert-Änderung<sup>167</sup> zurückzuführen ist (Abb. 19B und C). Bei einer starken Degranulation (Abb. 19C) ist deutlich zu erkennen, dass Zellstruktur und ursprüngliche Kompaktheit der Granula in den Zellen aufgelockert sind. Viele Granula befinden sich außerhalb der Zellmembran oder sind nicht mehr als Granula erkennbar, was auf eine massive Degranulation schließen lässt. Vergleicht man die MZ in Abb. 19A mit MZ in Abb. 19C waren die Veränderung der Granulafärbung und MZ-Morphologie besonders prägnant. Für die quantitative Auswertung der Degranulation (Abb. 19D) wurden MZ des jeweiligen Schnitts bei einer 1000fachen Vergrößerung unter Berücksichtigung der Einteilung in die genannten Degranulationsstadien gezählt. Die Injektion von Thrombin in das Mausohr führte

zu einem signifikanten Anstieg stark degranulierter MZ ( $846 \pm 9,8 \%$ ) im Vergleich zu moderat degranulierten MZ ( $9,5 \pm 5,9 \%$ ;  $P = <0,0001$ ) und nicht degranulierten MZ ( $5,8 \pm 7,0 \%$ ;  $P = <0,0001$ ). Bei den Vehikel-behandelten Ohren wiesen nicht degranulierte MZ den höchsten Anteil auf ( $43,5 \pm 12,7 \%$ ). Moderat ( $28,4 \pm 7,9\%$ ) und stark ( $28,2 \pm 19,2 \%$ ) degranulierte MZ waren ähnlich verteilt.

#### 4.6 Mastzell-Mediatoren verringern die Thrombinaktivität

Aus den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen geht hervor, dass MZ nach Stimulation mit Thrombin degranulieren und damit neben Mediatoren wie Histamin auch Proteasen wie  $\beta$ -Hexosaminidase freisetzen können<sup>11, 26</sup>. Um zu untersuchen, ob murine PCMC in der Lage sind Thrombin-degradierende Proteasen freizusetzen, wurden die Überstände von degranulierten MZ mit Thrombin inkubiert und im zeitlichen Verlauf die Aktivität des Thrombins bestimmt. Wie in Abb. 20 ersichtlich, erfolgte innerhalb von 3 h eine signifikante und fast vollständige Reduktion der Thrombinaktivität im Überstand von Ionomycin-stimulierten PCMC ( $2756 \pm 443,5$  RFU) im Vergleich zum Überstand unstimulierter PCMC ( $12741 \pm 201,9$  RFU) ( $P = <0,0001$ ). Auch nach 6 h war diese Abnahme nachweisbar (stimuliert  $1628 \pm 738,0$  RFU; unstimuliert  $12845 \pm 288,3$  RFU;  $P = 0,0026$ ). Diese Reduktion in der Thrombinaktivität deutet daraufhin, dass die von den hier verwendeten PCMC freigesetzten MZ-Mediatoren die Aktivität des Thrombin verringern.

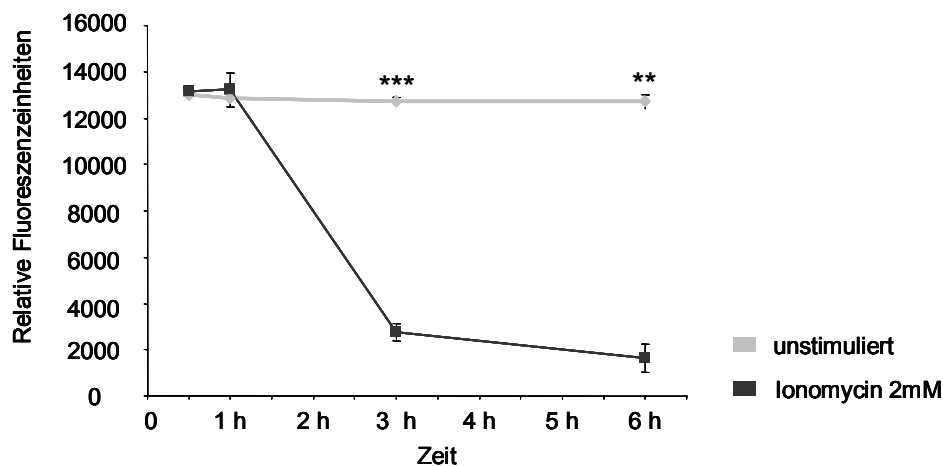


Abb. 20: Von MZ freigesetzte Mediatoren verringern die Thrombinaktivität. Die graue Kurve zeigt die Aktivität von Thrombin nach Zugabe zum Überstand der unstimulierten Zellen, die dunkelgraue Kurve nach Zugabe zum Überstand der Ionomycin stimulierten Zellen.  $n = 4$  unabhängige Experimente. \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

#### 4.7 Die murine Mastzell-Protease 4 limitiert die Thrombin-induzierte Entzündung

Aus der Literatur ist bekannt, dass mMCP4 Thrombin degradieren kann<sup>78</sup>. Darüber hinaus ist nachgewiesen, dass MZ dieses Enzym bei der sofortigen Degranulation freisetzen<sup>168</sup>. Abb. 21 zeigt, dass auch die hier verwendeten MZ-Populationen mMCP4 exprimieren. Mittels PCR wurde die Expression der mMCP4 und der HDC analysiert. Die HDC katalysiert die Bildung von Histamin aus Histidin, ein Prozess der für alle MZ repräsentativ ist. Die mMCP4, ein Enzym repräsentativ für den CTMC-Typ<sup>11</sup>, ist an vielen inflammatorischen Reaktionen beteiligt. Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, exprimieren beide Zellpopulationen sowohl HDC (Abb. 21A) als auch mMCP4 (Abb. 21B) auf mRNA-Ebene. Bei der Begutachtung der Transkriptbanden zeigte sich ein Unterschied in der Intensität für die mMCP4 zwischen BMCMC und PCMC. Um diesen Unterschied im Expressionsniveau genauer zu charakterisieren, wurde eine quantitative Real-Time PCR Analyse durchgeführt. Abb. 21C zeigt die relative Expression für *hdc* und *mcpt4* von BMCMC und PCMC bezogen auf die BMCMC. Die relative Expression der *hdc* ist in PCMC 15fach ( $15,25 \pm 10,04$ ), der *mcpt4* mehr als 600fach ( $655,72 \pm 585,69$ ) erhöht im Vergleich zu BMCMC.

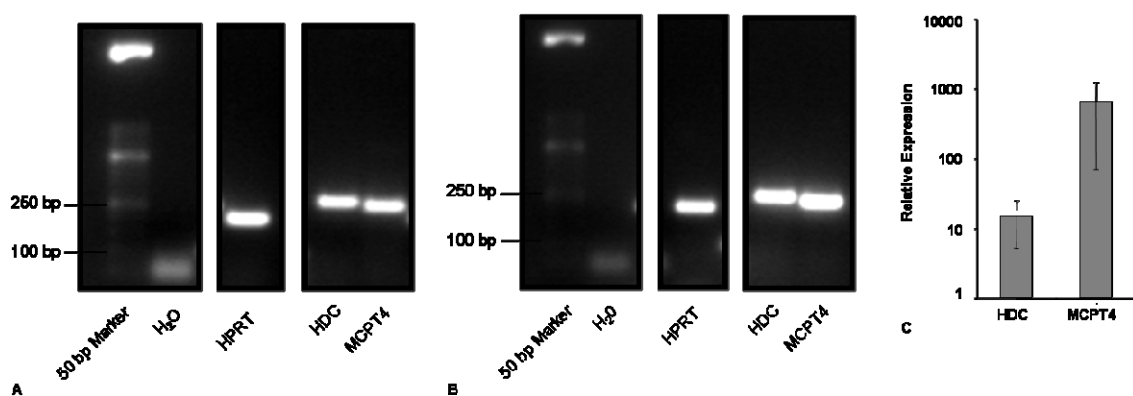


Abb. 21: BMCMC und PCMC exprimieren HDC und mMCP4. A) Expression *hdc* und *mcpt4* auf mRNA Ebene nach RT-PCR von BMCMCs und B) von PCMCs. C) Relative Expression der HDC und der mMCP4 im Vergleich von BMCMC zu PCMC, bezogen auf die BMCMC.

Mit dem Ziel, den Einfluss der mMCP4 bei der Limitierung der Thrombin-induzierten lokalen kutanen Inflammation zu untersuchen, wurde die Veränderung der Ohrdicke nach Injektion von Thrombin in C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen sowie in entsprechenden WT C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen gemessen (Abb. 22). Die Thrombininjektion löste im zeitlichen Verlauf in C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen sowie in C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen eine starke Ohrschwellung im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ohren aus ( $P \leq 0,0001$ ). Die Analyse der Ohrschwellung Thrombin-behandelter Ohren im zeitlichen Verlauf zeigte eine signifikante Erhöhung der Ohrschwellung in C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäuse ( $P \leq 0,0001$ ). Die maximale Ohrschwellung wurde nach 1 h gemessen. Sie wies einen signifikanten Unterschied zwischen Thrombin-behandelten C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> und C57BL/6

*MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen auf ( $171,9 \pm 32,5 \mu\text{m}$  versus  $114,9 \pm 47,3 \mu\text{m}$ ;  $P = 0,004$ ). Im zeitlichen Verlauf wurde eine kontinuierliche Reduktion der Ohrschwellung in beiden Gruppen von Mäusen gemessen. Nach 6 h war kein signifikanter Unterschied in der Ohrschwellung bei den Thrombin-behandelten C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen ( $73,2 \pm 20,3 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu den C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen ( $51,5 \pm 28,2 \mu\text{m}$ ) nachweisbar.

Der Verlauf der Ohrschwellung in den Thrombin-behandelten Ohren unterscheidet sich in keiner der verschiedenen Kurven. Die signifikant erhöhte Ohrschwellung in den C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen zeigt, dass die mMCP4 der MZ einen entscheidenden inhibierenden Effekt auf die Intensität der Ohrschwellung hat.

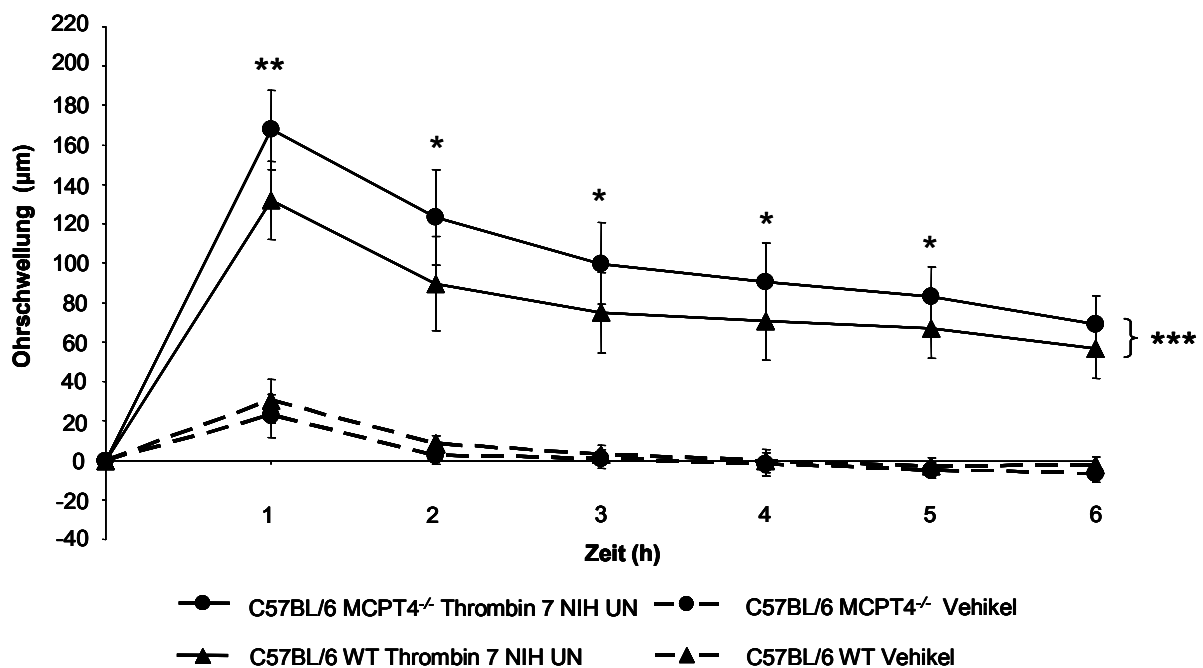


Abb. 22: mMCP-4 trägt zur Kontrolle von Thrombin-vermittelten Entzündungsreaktionen in der Haut bei. Darstellung der Ohrschwellung nach Thrombininjektion. Die schwarze Kurve mit den Kreisen zeigt die C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäuse und die schwarze Kurve mit den Dreiecken zeigt die WT Mäuse. Die Kurven mit der gestrichelten Linie und den gleichen Symbolen ist die jeweils entsprechende Vehikelkontrolle. Pro Gruppe n = 10, 2 unabhängige Experimente.

In Abb. 23 sind exemplarisch Giemsa gefärbte Ohrschnitte dargestellt. Ein Vergleich der Vehikel-behandelten Ohren von C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> und C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 23A und C) mit den jeweiligen Thrombin-behandelten Ohren (Abb. 23B und D) illustriert, dass die Vehikelbehandlung keinen Einfluss auf die Morphologie sowohl des Ohrs per se als auch auf die der MZ hatte. Die MZ (schwarze Pfeile) sind deutlich anhand ihrer dunkelvioletten Färbung zu erkennen. Die Thrombinbehandlung führte zu einer Zunahme der Ohrdicke sowohl in C57BL/6 *MCP4*<sup>+/+</sup> Mäusen (Abb. 23B) als auch in C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 23D). Ebenso ist eine prägnante Veränderung der MZ-Morphologie in den Thrombin-behandelten Mäusen auffällig. Die Granula sind wesentlich heller gefärbt, die Zellstruktur ist deutlich aufgelockert. Die MZ per se ist deutlich schwieriger zu erkennen. Auch hier ist eine



Zunahme der Ohrdicke deutlich zu erkennen ebenso wie ein Einstrom von granulären Leukozyten.

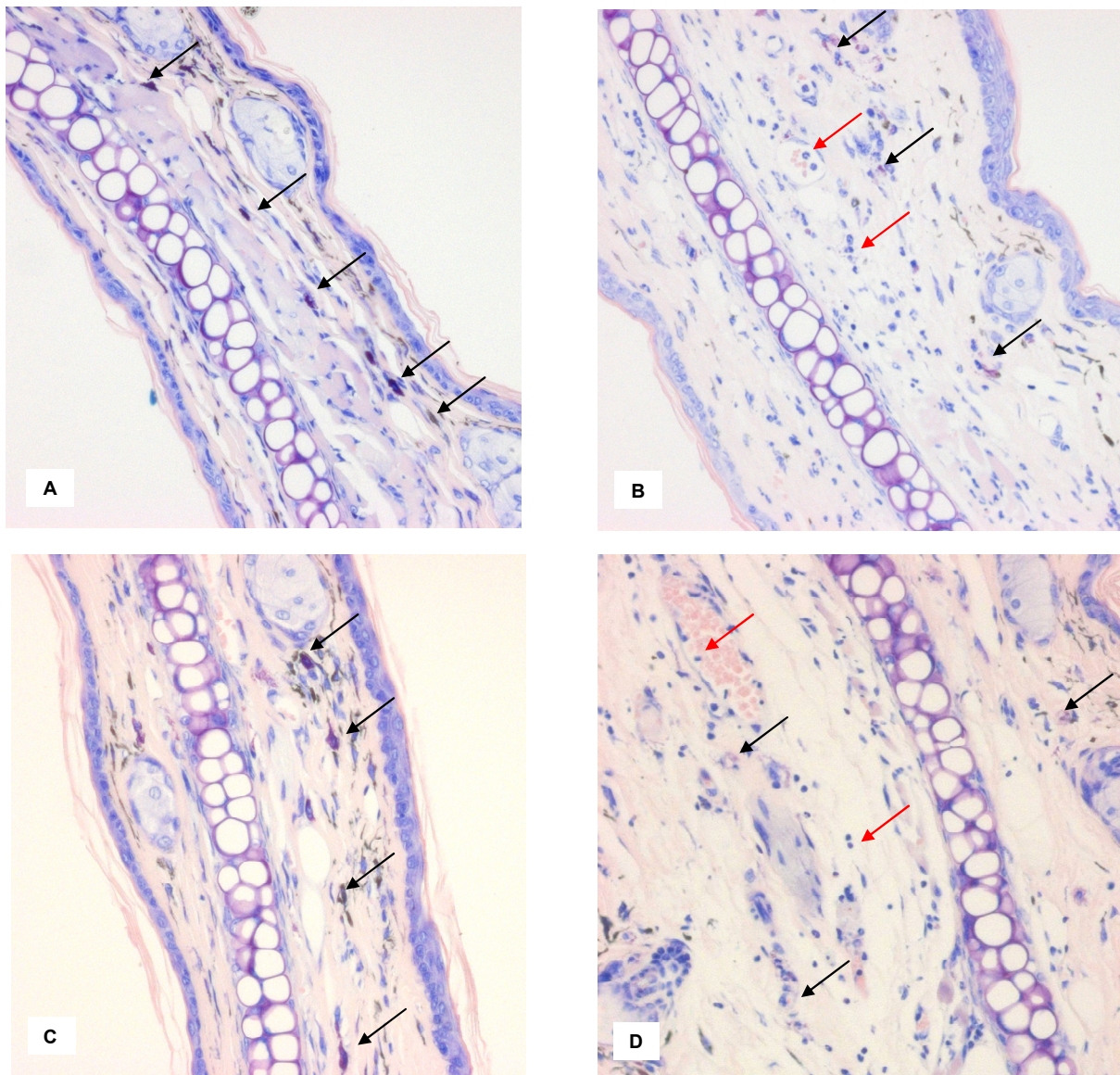


Abb. 23: Die Thrombin-induzierte Entzündungsreaktion führt in C57BL/6  $MCP4^{+/+}$  Mäusen zu einer Entzündungsreaktion. Histologische Übersicht der Ohrschnitte nach Giemsa-Färbung. (A) und (C) nach 6 h Vehikelbehandlung und (B) und (D) nach 6 h Thrombinbehandlung; (A) und (B) C57BL/6  $MCP4^{+/+}$  Mäuse, (C) und (D) C57BL/6  $MCP4^{-/-}$  Mäuse in einer 200fachen Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile markieren MZ, die roten Pfeile Granulozyten.

Sowohl die hier dargestellten Ohrschwellungskurven als auch die histologischen Abbildungen belegen einen Einfluss der mMCP4 auf die Limitierung der Sofortreaktion durch MZ nach Thrombinstimulation.

## 5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Stimulation von primären Mastzellen (MZ) mit Thrombin *in vitro* zur Degranulation und Mediatorfreisetzung führt. Die weiterführenden *in vivo* Untersuchungen an einem Modell für eine lokale Entzündung weisen erstmals nach, dass durch MZ-Aktivierung Mediatoren freigesetzt werden, die eine durch Thrombin ausgelöste Entzündungsreaktion limitieren.

Die in dieser Arbeit genutzten murinen Zellen exprimierten sowohl den hochaffinen Fc<sub>ε</sub>-Rezeptor als auch den Stammzellfaktor (SCF)-Rezeptor Kit (CD117), beides charakteristische Marker für MZ<sup>20</sup>. Die knochenmarksgenerierten MZ (BMCMC) stellen dabei erwartungsgemäß eine hochreine MZ-Population dar<sup>61</sup>. Die hier verwendeten Kultivierungsbedingungen für die aus der Peritoneallavage gewonnenen MZ (PCMC) begünstigen zusätzlich auch das Wachstum anderer Zellpopulationen im Gegensatz zu den von Malbec und Kollegen beschriebenen PCMC<sup>63</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um Lymphozyten, Fibroblasten und Makrophagen handelt, von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls Thrombinrezeptoren (Proteinase-aktivierbare Rezeptoren [PAR]) auf der Oberfläche tragen<sup>132,127</sup>. Eine Verunreinigung der MZ mit diesen Zelltypen kann somit das Ergebnis der Stimulation beeinflussen. Dadurch war für die Untersuchung von PCMC vor der Nutzung für verschiedenen Stimulationsversuche und Expressionsanalysen eine Aufreinigung nötig. Die Sortierung der Zellen am Durchflusszytometer führte zu einer hochreinen MZ-Population, die für die Versuche verwendet wurde. Somit konnten die *in vitro* kultivierten MZ als Modellsystem für eine mögliche Interaktion von Thrombin und MZ via PAR genutzt werden.

Um zu überprüfen, ob die hier verwendeten MZ in der Lage sind, auf eine Thrombinstimulation zu reagieren, wurde eine mRNA-Expressionsanalyse der BMCMC und PCMC durchgeführt. Diese Untersuchung zeigt, dass beide MZ-Typen mRNA für die Thrombinrezeptoren PAR1, 3 und 4 exprimieren. Ein quantitativer Unterschied des mRNA Expressionslevels wurde für die drei Thrombinrezeptoren in den zwei verschiedenen MZ-Typen nicht festgestellt. Dies bestätigt die Arbeit von Zhang und Kollegen, die die Expression von allen Thrombinrezeptoren für die murine MZ-Linie P815 beschrieben haben<sup>169</sup>. Im humanen System ist ebenfalls die Expression aller Thrombinrezeptoren nachgewiesen<sup>111</sup>. Zusätzlich wurde auch die Expression für PAR1 in PMC, isoliert aus Ratten, von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert<sup>170-172</sup>. Für murine PCMC sowie BMCMC wurde das Expressionsmuster der PAR noch nicht hinreichend untersucht.



Da keine geeigneten Antikörper für einen Nachweis von PAR auf der Zelloberfläche kommerziell erhältlich sind, ist der Proteinnachweis für PAR nur indirekt über eine funktionelle Analyse möglich. Dafür wurde die Degranulation von MZ nach Thrombinstimulation anhand der Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase untersucht. MZ, die direkt nach der Peritonealavage (PMC) verwendet wurden, weisen die höchste Freisetzung auf. Dies steht im Einklang zu publizierten Daten, die zeigen, dass PMC aus Ratten nach Thrombinstimulation ebenfalls mit einer Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase reagieren<sup>172</sup>. Auch die hier verwendeten PCMC zeigen wie die PMC eine dosisabhängige Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase nach Thrombinstimulation. Die BMCMC weisen nur eine sehr geringe  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung nach Thrombinstimulation auf. Für eine genauere Untersuchung, welche PAR an der Degranulation beteiligt sind, wurden PAR agonistische Peptide (AP) verwendet. Diese AP aktivieren den jeweiligen PAR spezifisch<sup>151</sup>. Entwickelt wurden diese PAR-AP auf der Grundlage der spezifischen Aminosäuresequenz, die nach dem Schneiden durch die Serinprotease freigelegt wird, wobei die Spezifität der jeweiligen PAR-AP häufig mittels Plättchenaggregation oder Kalziumfreisetzung ermittelt wird<sup>151</sup>. Um zu untersuchen welche der drei Thrombinrezeptoren PAR1, 3 und 4 auf der Oberfläche von MZ exprimiert werden, wurden ein PAR1-AP<sup>153</sup> und ein PAR4-AP<sup>155</sup> verwendet. PAR3 fungiert im murinen System als Korezeptor von PAR4<sup>125</sup>, sodass dessen Einfluss auf die MZ hier vernachlässigt werden konnte. Nach der Stimulation mit einem PAR1-AP zeigen PMC die höchste  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung, BMCMC ließen sich nicht degranulieren. Die Stimulation von BMCMC mit dem PAR4-AP wurde nicht durchgeführt, da dieser MZ-Typ mit keiner  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung nach Inkubation mit dem PAR1-AP reagiert hat, und auch nur mit einer sehr schwachen Freisetzung nach Thrombinstimulation. Direkt isolierte PMC konnten aufgrund der hohen Spontanfreisetzung nach Stimulation mit den PAR1-AP und Thrombin sowie einer geringen Ausbeute nicht für die nachfolgenden Analysen verwendet werden. PCMC reagieren sowohl nach PAR1-AP als auch nach PAR4-AP Stimulation mit einer erhöhten Freisetzung an  $\beta$ -Hexosaminidase. Durch die Verwendung der PAR-AP konnte gezeigt werden, dass PCMC sowohl nach PAR1 als auch nach PAR4 Stimulation degranulieren, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass beide Thrombinrezeptoren, PAR1 und PAR4, an der Oberfläche der PCMC exprimiert werden.

Interessanterweise führt auch die Inkubation von PCMC mit PAR1- bzw. PAR4- spezifischen antagonistischen Peptiden (AtP) und einem chemischen PAR1-Antagonisten zu einer deutlichen Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase. Beide hier verwendeten Peptidantagonisten sind in der Literatur als PAR-Antagonisten beschrieben worden<sup>157, 160</sup>. Allerdings weist der hier eingesetzte PAR1-AtP, TFLLRNPNDK, eine Homologie zur PAR1 Signalsequenz SFLLRN auf. Das daraus abgeleitete PAR1-AP, SFLLRN, wurde auch als PAR2-AP

beschrieben<sup>173, 174</sup>. Somit wird der hier verwendete PAR1-AtP sehr wahrscheinlich PAR1 hemmen, PAR2 hingegen aktivieren. Eine Aktivierung der MZ über PAR2 ist möglich, da verschiedene Gruppen zeigen konnten, dass MZ PAR2 exprimieren<sup>107, 111</sup>. Eine Degranulation von MZ nach PAR2 Stimulation wurde ebenfalls beschrieben<sup>140</sup>. Folglich könnte die gemessene Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase nach Stimulation mit dem hier verwendeten PAR1-AtP auf die Expression und Aktivierung des PAR2 auf den hier untersuchten MZ zurückzuführen sein. SCH79797, ein Antagonist für PAR1, der nicht auf der „tethered ligand“ Peptidsequenz beruht<sup>158</sup>, hemmt die Thrombin- oder auch PAR1-AP-induzierte Plättchenaggregation sowie die Kalziummobilisation in glatten Muskelzellen<sup>159</sup>. Effekte des Antagonisten auf Zellen PAR1-defizienter Mäuse legen nahe, dass es weitere Zielmoleküle für SCH79797 gibt<sup>175</sup>. Die in dieser Arbeit gemessene Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase durch den PAR1 Antagonisten SCH79797 könnte somit eventuell PAR unabhängig ausgelöst worden sein. Der PAR4 wurde als bisher letzter Thrombinrezeptor beschrieben<sup>106</sup>. Die Entwicklung eines selektiven PAR4-AtP erfolgte in der letzten Dekade des 20. Jahrhunderts anhand von Plättchenaggregationstests<sup>160</sup>. Die Untersuchung von MZ mittels des PAR4-AtP ist noch Gegenstand der Forschung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das PAR4-AtP in den hier analysierten MZ zu einer Mediatorfreisetzung führt, die PAR-unabhängig ist oder über andere PAR vermittelt wird.

Die durch PAR-Antagonisten ausgelöste Degranulation von MZ verhinderte die Durchführung von Experimenten, bei denen durch spezifische Blockade einzelner PAR der Einfluss von Thrombin über PAR auf MZ untersucht werden sollte. Diese Experimente sollten einen genaueren Aufschluss über die Beteiligung der einzelnen PAR an der Thrombin-induzierten Aktivierung von MZ geben.

Für die folgenden Analysen weiterer MZ-Mediatoren wurden ausschließlich PCMC verwendet, da sie eine geringe Spontanfreisetzung an  $\beta$ -Hexosaminidase aufweisen, gleichzeitig aber mit einer deutlichen Sezernierung von  $\beta$ -Hexosaminidase nach Stimulation von Thrombin und dem PAR-AP reagieren. Außerdem ähneln die PCMC phänotypisch den CTMC<sup>13, 87, 176</sup>. Dies ist von entscheidender Relevanz, da im Anschluss an die *in vitro* Analyse *in vivo* Untersuchungen am Mausohr durchgeführt wurden. Dermale MZ wiederum entsprechen den CTMC<sup>5, 13</sup>, wodurch die PCMC (als Modell der CTMC) die am besten geeigneten primären MZ für *in vitro* Untersuchungen darstellen.

Die Histaminfreisetzung ist ebenso wie die  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung charakteristisch für aktivierte MZ<sup>177, 178</sup>. Die Stimulation von PCMC mit Thrombin führt zu einer dosisabhängigen Freisetzung von Histamin. Mit PAR1-AP stimulierte PCMC zeigen bei der Histaminfreisetzung einen Trend ähnlich dem der Thrombinstimulation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an PMC aus Ratten, die zeigen, dass eine

Stimulation mit Thrombin<sup>179</sup> oder einem PAR1-AP<sup>172</sup> zu einer dosisabhängigen Freisetzung von Histamin führt. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Histaminfreisetzung stützt die oben dargestellten Ergebnisse, dass PCMC nach Thrombinstimulation degranulieren.

Um zu überprüfen, ob MZ nach Aktivierung durch Thrombin noch weitere Mediatoren freisetzen, wurde die Sezernierung des *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) und des *tumor necrosis factor* (TNF) untersucht. Beide Mediatoren sind für eine frühe Entzündungsreaktion kennzeichnend. MCP-1 kann von MZ produziert werden<sup>180</sup>, aber auch zu einer MZ-Aktivierung führen<sup>181</sup>. TNF liegt vorgeformt in den MZ-Granula vor und kann im Verlauf einer Degranulation<sup>26</sup>, aber auch unabhängig von einer Degranulation freigesetzt werden. Die Stimulation mit Thrombin führte zu keinem deutlichen Anstieg der MCP-1 Freisetzung nach 1 h im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Eine leichte dosisabhängige Steigerung der Freisetzung war jedoch erkennbar. Nach 24 h war kein Unterschied in der MCP-1 Sezernierung messbar. Untersuchungen an Endothelzellen und Monozyten stimuliert mit Thrombin zeigen erst nach 4 h einen Anstieg der MCP-1 Transkripte<sup>120</sup>. Möglicherweise war der in dieser Arbeit gewählte Untersuchungszeitpunkt nicht ideal. In nachfolgenden Untersuchungen würde eine Messung der MCP-1 Konzentration zusätzlich nach 3 h, 6 h und 12 h einen Überblick über die Kinetik der MCP-1 Freisetzung geben. Die Analyse der MCP-1 Konzentration nach 1 h Stimulation mit dem PAR1-AP wies einen schwach dosisabhängigen Anstieg der Freisetzung nach. Im Gegensatz dazu war nach 24 h eine schwach dosisabhängige Abnahme der MCP-1 Konzentration messbar. Die Abnahme der Chemokinkonzentration könnte auf einen Abbau dieses Proteins zurückzuführen sein. Wie oben beschrieben führt die Stimulation von PCMC mit Thrombin oder dem PAR1-AP zu einer Degranulation und folglich zur Freisetzung von verschiedenen MZ-Proteasen, von denen bekannt ist, dass sie Peptide degradieren<sup>42</sup>. Möglicherweise können freigesetzte MZ-Mediatoren auch das MCP-1 abbauen. Bei den hier untersuchten MZ führt die Stimulation mit Thrombin oder dem PAR1-AP zu keiner detektierbaren Freisetzung von TNF. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen der MZ-Zelllinie C1.MC/C57, die zeigten, dass die Stimulation der MZ mit Thrombin für 24 h in einer Freisetzung von IL-6 resultiert, nicht aber in einer signifikant erhöhten Freisetzung von TNF<sup>112</sup>. Die Stimulation mit Thrombin und die daraus resultierende Aktivierung bzw. Mediatorfreisetzung ist somit immer in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellpopulation zu betrachten. Verschiedene Zellpopulationen wie beispielsweise MZ, Endothelzellen oder Monozyten sezernieren nach Thrombin- oder PAR-AP-Stimulation nicht zwangsläufig die gleichen Mediatoren zum gleichen Zeitpunkt.

Die *in vitro* nachgewiesene Degranulation der PCMC nach Stimulation mit Thrombin legt die Vermutung nahe, dass MZ *in vivo* in der Haut ebenfalls durch Thrombin aktiviert werden können, zumal PCMC den CTMC aus dem Bindegewebe der Haut ähneln<sup>13, 87, 176</sup>. Um die

PAR-vermittelte Aktivierung von MZ durch die Serinprotease Thrombin *in vivo* zu untersuchen, wurde erstmalig Thrombin in ein Mausohr injiziert und die resultierende Schwellung, ein Maß für die lokale Entzündungsreaktion<sup>164, 166, 182, 183</sup>, gemessen.

In den C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäusen führt die Injektion von Thrombin zu einer sofortigen, deutlich messbaren Ohrschwellung mit einem gemessenen Maximum nach 1 h, gefolgt von einer Plateauphase über 2 – 4 h. Anschließend nimmt die Ohrschwellung kontinuierlich ab, bis nach 6 h nahezu die ursprüngliche Ohrdicke erreicht ist. Ein Vergleich der Kinetik der Thrombin-induzierten Ohrschwellung mit einer allergischen Sofortreaktion, ausgelöst durch die Quervernetzung der IgEs über das spezifische Allergen, weist Unterschiede auf. Zwar ähneln sich beide darin, dass sie ein Maximum nach 1 h aufweisen, jedoch nimmt die IgE-abhängige Schwellung im zeitlichen Verlauf deutlich schneller ab als die durch Thrombin ausgelöste Ohrschwellung<sup>184</sup>. Gemeinsam ist beiden, dass keine Spätreaktion ausgelöst wird, welche typisch für den verzögerten Typ der Hypersensitivität ist. Ein Modell für diese Reaktion ist die *contact hypersensitivity reaction* (CHS)<sup>185,186</sup>. Dabei werden nach einem Erstkontakt mit einem chemischen Allergen spezifische T-Zellen aktiviert, welche nach einem Zweitkontakt mit dem Allergen in die behandelte Haut einwandern und dort eine lokale T-Zell-vermittelte und somit adaptive Entzündungsreaktion auslösen<sup>187</sup>. Diese ist durch eine späte Entzündungsreaktion gekennzeichnet<sup>188, 189</sup>. Bei der hier durchgeführten Untersuchung wurde jedoch 24 h, 48 h und 72 h nach Thrombinbehandlung kein Anstieg der Ohrschwellung in den C57BL/6 *Kit*<sup>+/+</sup> Mäusen gemessen, sondern eine weitere kontinuierliche Abnahme. Dies deutet darauf hin, dass die Thrombin-induzierte Ohrschwellung keine T-Zellantwort auslöst.

Die Injektion von Thrombin in MZ-defiziente Mäuse (C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>) löst erstaunlicherweise eine massive Ohrschwellung aus, deutlich höher als in MZ-kompetenten Mäusen. Dies ist überraschend, da MZ als proinflammatorisch und vasodilatatorisch wirkende Zellen beschrieben sind<sup>190</sup>. Um eine mögliche MZ-Abhängigkeit dieses Befundes zu überprüfen, wurde die lokale MZ-Population wiederhergestellt. Die Rekonstitution der MZ-Population wurde durch eine intradermale Injektion von WT BMCMC in die Ohren von MZ-defizienten Mäusen erreicht<sup>191</sup>. Die erhöhte Ohrschwellung in Abwesenheit der MZ in C57BL/6 *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäusen wurde durch eine erfolgreiche Rekonstitution wieder aufgehoben. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass MZ an der Limitierung der Thrombin-induzierten Entzündung beteiligt sind.

Anhand der histologischen Untersuchung von semidünnen Ohrschnitten 6 h nach Thrombininjektion wurde gezeigt, dass MZ nach Thrombinbehandlung degranulieren. Die histologische Begutachtung der HE-gefärbten Ohrschnitte zeigt zusätzlich ein Zellinfiltrat, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um polymorphkernige Leukozyten handelt. Diese Zellen wurden wahrscheinlich durch die Freisetzung von chemotaktischen Mediatoren von MZ

angelockt. Diese Entzündungszellen können aber ebenso durch aktivierte Endothelzellen und Fibroblasten und der damit verbundenen Veränderung der Gefäße rekrutiert worden sein. Die dargestellten Resultate legen den Schluss nahe, dass durch die Injektion von Thrombin eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst wurde. Die Hypothese, dass MZ an der Limitierung der Ohrschwellung beteiligt sind, kann konkretisiert werden. MZ degranulieren *in vivo* nach Thrombininjektion. Es ist folglich sehr wahrscheinlich, dass MZ durch die Degranulierung Mediatoren freisetzen, die die Entzündungsreaktion limitieren, ähnlich der Detoxifizierung von Schlangengiften<sup>43, 192</sup>. Die gewonnenen Ergebnisse werfen somit folgende Frage auf. Wodurch können MZ eine Limitierung der Entzündungsreaktion bewirken? Die Aktivierung von PAR ist ein irreversibler Prozess, bei dem die Protease, in diesem Fall Thrombin, den Rezeptor schneidet, eine Konformationsänderung hervorruft und anschließend eine Signalkaskade auslöst<sup>101</sup>. Eine Schwächung dieser Reaktion könnte also über die Inaktivierung der aktivierenden Protease induziert werden. *In vitro* wurde übereinstimmend mit Daten von Pejler und Kollegen<sup>193</sup> gezeigt, dass der Überstand von degranulierten MZ Mediatoren enthält, die die Thrombinaktivität hemmen. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass MZ durch die Freisetzung von Mediatoren an der Limitierung der Entzündungsreaktion beteiligt sein könnten. Vermutlich sind freigesetzte MZ-Enzyme ausschlaggebend für die Limitierung der Entzündungsreaktion. Mögliche Kandidaten wären MZ-Proteasen<sup>11, 194</sup>. Schon 1994 konnten Pejler und Kollegen zeigen, dass MZ-Mediatoren Thrombin degradieren<sup>193</sup>. Dieselbe Arbeitsgruppe wies einige Jahre später nach, dass mMCP4, eine Chymase, die präformiert in den MZ vorliegt und nach der Aktivierung der MZ sezerniert wird<sup>168</sup>, Thrombin schneidet und inaktiviert<sup>78</sup>. Demzufolge wären MZ in der Lage eine Thrombin-vermittelte Reaktion durch Freisetzung der mMCP4 zu limitieren. Um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurden mMCP4 knock out Mäuse (C57BL/6 *mMCP4*<sup>-/-</sup>) analysiert. Die Behandlung dieser Tiere mit Thrombin führt zu einer signifikant erhöhten Ohrschwellung im Vergleich zu den WT Mäusen. Dies legt den Schluss nahe, dass die mMCP4 an der Inaktivierung von Thrombin beteiligt ist, und, wenn auch nicht ausschließlich, die Limitierung der Entzündungsreaktion hervorruft. Die Hypothese der Beteiligung von MZ an der Limitierung durch Freisetzung eines MZ-Mediators konnte hiermit bestätigt werden. Die Durchführung einer lokalen Rekonstitution von C57BL/6 *mMCP4*<sup>-/-</sup> Mäusen mit BMCMC aus WT-Mäusen würde diese Hypothese genauer überprüfen, war aber aufgrund von Problemen mit der Zucht der C57BL/6 *MCP4*<sup>-/-</sup> Mäuse im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Ergebnisse verdeutlichen, dass MZ nach Thrombinstimulation degranulieren, *in vivo* eine lokale Entzündungsreaktion auslösen und diese durch die Sezernierung eines MZ-Mediators, mMCP4, zumindest in Teilen limitieren.

*In vitro* zeigte sich, dass die Intensität der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung vom Phänotyp der MZ abhängig ist. Die drei hier analysierten MZ-Populationen repräsentieren zwei verschiedene MZ-Typen, MZ der Schleimhaut (mucosa type mast cells [MMC]) und MZ des Bindegewebes (connective tissue mast cells [CTMC])<sup>5</sup>. Die BMCMC ähneln den MMC, die unter anderem durch einen geringeren Gehalt an Proteasen und Histamin in den Granula im Vergleich zu den CTMC gekennzeichnet sind. Die PMC ähneln den CTMC, da sie im Vergleich zu den MMC einen höheren Proteasegehalt aufweisen<sup>5</sup>. MZ, die aus dem Peritoneum isoliert und anschließend durch Kultur angereichert wurden (PCMC), ähneln ebenfalls den CTMC<sup>63</sup>. Die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Unterschiede zwischen den PMC und den PCMC sind gering<sup>63</sup>. Diese Analysen der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung nach Stimulation mit Thrombin und den PAR-AP legen den Schluss nahe, dass MZ des CTMC-Typs, hier repräsentiert durch PMC und PCMC, auf der Zelloberfläche Thrombinrezeptoren exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigen MZ des MMC-Typs, hier vertreten durch BMCMC, nur eine sehr geringe Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase nach Thrombinstimulation und keine Freisetzung nach PAR1-AP-Stimulation. Diese Diskrepanz bezüglich der  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung verdeutlicht möglicherweise den phänotypischen Unterschied zwischen den verschiedenen MZ-Typen MMC und CTMC. Weiterhin könnte die unterschiedliche  $\beta$ -Hexosaminidasefreisetzung auch auf eine geringere Expressionsdichte der Thrombinrezeptoren auf der Oberfläche der BMCMC im Vergleich zu den PMC oder PCMC zurückzuführen sein. Somit können diese Zellen im Vergleich zu PMC oder PCMC nicht so effizient auf eine Thrombinstimulation reagieren. Außerdem kann auch die Degranulation des Enzyms Kathepsin G zu einer Inaktivierung des PAR1 führen<sup>135</sup>. Studien zeigen, dass Kathepsin G PAR am aminoterminalen Ende entfernt von der spezifischen Thrombinschnittstelle schneiden kann. Dadurch wird die Signalsequenz entfernt und der Rezeptor kann nicht mehr durch Thrombin aktiviert werden<sup>135</sup>. Wenn eine geringere Expressionsdichte des PAR1 auf BMCMC im Vergleich zu CTMC vorliegt, würde diese Inaktivierung eine effiziente Reaktion der BMCMC auf Thrombin- oder PAR1-AP-Stimulation zusätzlich vermindern.

Es ist bekannt, dass MZ nach Aktivierung *in vivo* eine Sofortreaktion hervorrufen können. Diese Aktivierung der MZ kann unter anderem durch die Quervernetzung des IgE über das spezifische Antigen<sup>195</sup> oder durch das Erkennen von Bakterien<sup>196</sup> erfolgen. Die anschließende Freisetzung verschiedener Mediatoren, die aktivierend auf das Endothel wirken, beispielsweise Histamin<sup>197, 198</sup> und VEGF<sup>199</sup>, führt zu einer Vasodilatation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Gleichzeitig werden chemotaktische Faktoren sezerniert, die einen Einstrom von Leukozyten hervorrufen, wie IL-8<sup>200, 201</sup> und TNF<sup>46, 202-204</sup>. Durch die zusätzlich induzierte Expression von Adhäsionsmarkern wie Selektinen wird das Rollen und

die Adhäsion der Leukozyten begünstigt<sup>205, 206</sup>. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass MZ selbst auch an der Induktion der Ohrschwellung beteiligt sind. Dies würde erklären, warum MZ-kompetente Mäuse eine Ohrschwellungsreaktion ausbilden. Ferner deutet die nachgewiesene Induzierung einer Thrombin-abhängigen Ohrschwellung in MZ-defizienten Mäusen darauf hin, dass die Ohrschwellung auch unabhängig von MZ ausgelöst werden kann. Verantwortlich ist dafür sehr wahrscheinlich die Interaktion von Thrombin mit verschiedenen anderen Zellpopulationen. Sowohl Nervenzellen, Endothelzellen als auch Fibroblasten exprimieren PAR und sind somit in der Lage nach Stimulation inflammatorisch zu reagieren<sup>103, 127</sup>. Eine Stimulation von Neuronen mit Thrombin führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit letztlich zu einer Aktivierung<sup>117</sup>. Endothelzellen reagieren nach Thrombinstimulation mit einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität<sup>207</sup> und induzieren die Expression von Selektinen<sup>118</sup>. Zusätzlich werden verschiedene Angiogenese-fördernde Faktoren sezerniert, beispielsweise VEGF-C und MMP-9<sup>121</sup>. Fibroblasten reagieren unter anderem mit der Freisetzung des MCP-1<sup>114</sup>. Sowohl Endothelzellen als auch Fibroblasten sind somit in der Lage, den Einstrom von Leukozyten nach Aktivierung mit Thrombin einzuleiten, und könnten folglich auch unabhängig von MZ für die deutlich messbare Ohrschwellung verantwortlich sein. In MZ-defizienten C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen wird diese Ohrschwellung durch die Abwesenheit von MZ zusätzlich verstärkt.

Neben der in dieser Arbeit nachgewiesenen Inaktivierung von Thrombin durch das Schneiden der mMCP4 ist eine weitere Möglichkeit der Thrombininhibition durch einen MZ-Mediator denkbar. Die aktivierte MZ setzt unter anderem das Polysaccharid Heparin frei<sup>198</sup>, welches für seine antikoagulative Wirkung bekannt ist. Diese gerinnungshemmende Wirkung beruht auf der Bindung von Heparin an Antithrombin III, einem Thrombininhibitor. Die Bindung an Antithrombin III beschleunigt die durch Antithrombin III katalysierte Reaktion der Thrombinhemmung um ein Vielfaches<sup>208, 209</sup>. Somit kann die MZ zusätzlich zu ihrer inflammatorischen Wirksamkeit nach Thrombinaktivierung auch auf die Gerinnung Einfluss nehmen. Des Weiteren können andere Proteasen der Gerinnungskaskade, wie zum Beispiel der Faktor Xa, PAR1 und 2 aktivieren<sup>210</sup>. Da MZ diese beiden Rezeptoren exprimieren<sup>100, 107</sup>, ist eine zusätzliche MZ-Modulation möglich. Die MZ ist folglich auf vielfältige Art und Weise an der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Blutung und Blutgerinnung beteiligt.

Die Degranulation der MZ führt zur Freisetzung verschiedener Proteasen, unter anderem der Serinprotease Trypsin, welche vorgeformt in den MZ Granula vorliegt<sup>211-213</sup>. Es ist bekannt, dass die MZ-Trypsin den PAR2 aktivieren kann<sup>129, 142, 214</sup>. Aufgrund der Expression von PAR2 auf dermalen MZ<sup>111</sup> besteht die Möglichkeit einer autokrinen Regulierung der MZ. Ebenso exprimieren verschiedene Zelltypen der Haut, beispielsweise Fibroblasten<sup>215</sup> oder

Endothelzellen PAR2<sup>142</sup>. Fibroblasten proliferieren nach Aktivierung über PAR2 durch Tryptase<sup>215</sup>, Endothelzellen setzen IL-8 frei<sup>216</sup>. Auf diese Weise können zusätzlich zur Aktivierung von MZ über Thrombin auch benachbarte Zellen über die MZ-Tryptase / PAR2 Interaktion parakrin aktiviert werden<sup>217, 218</sup>, wodurch sie wiederum Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen können und eine Rekrutierung von Leukozyten bewirken können.

Die gleichzeitige Induzierung eines „feedback“ Mechanismus, der die ausgelöste Entzündung limitiert, ist von entscheidender Bedeutung, da eine körpereigene Terminierung einer Entzündungsreaktion physiologisch sinnvoll ist. Eine andauernde Entzündung hätte eine ständige Schädigung des betroffenen Gewebes zur Folge, was möglicherweise eine Ausweitung hin zu einer systemischen Entzündungsreaktion bewirken könnte. Die Regulierung einer solchen MZ-induzierten Entzündung lässt sich anhand des Endothelin-1 beschreiben. Während der Entzündungsreaktion wird Endothelin-1, ein stark vasokonstriktorisches Peptidhormon, aus den aktivierten Endothelzellen freigesetzt<sup>219</sup>. Schon seit den 1990er Jahren ist bekannt, dass auch MZ nach Aktivierung Endothelin-1 sezernieren<sup>220-222</sup>. Zusätzlich können sie aber auch durch die Interaktion von Endothelin-1 mit dem Endothelin Rezeptor A auf MZ aktiviert werden und Histamin freisetzen<sup>223, 224</sup>. Eine Aktivierung von MZ über Endothelin-1 führt zur Degranulation der MZ und somit zur Freisetzung der MZ-Chymase, welche Endothelin-1 degradiert<sup>42</sup>. In einem Sepsismodell konnte gezeigt werden, dass MZ durch die Interaktion zwischen Endothelin-1 und den von MZ exprimierten Endothelin-Rezeptor A schützend wirken<sup>42</sup>. Bei dieser Entzündungsreaktion werden MZ aktiviert, degranulieren und setzen eine Protease frei, die die Entzündung wieder limitiert. Ähnlich läuft es bei der in dieser Arbeit untersuchten Thrombinaktivierung. Die MZ wird durch Thrombin über PAR aktiviert, degranuliert und sezerniert eine Protease, mMCP4, welche Thrombin inaktivieren kann und somit zu einer Limitierung der Entzündungsreaktion beiträgt. Denkbar wäre auch eine Überschneidung dieser beiden Mechanismen, da gezeigt wurde, dass die Aktivierung des PAR1 auf Fibroblasten durch Thrombin in einer Freisetzung von Endothelin-1 resultiert<sup>225</sup>. Eine mögliche Freisetzung von Endothelin-1 aus Fibroblasten oder MZ nach Thrombinstimulation könnte somit sowohl eine auto- als auch eine parakrine Stimulation der MZ sowie eine Degranulation auslösen. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Thrombin und MZ während der Bekämpfung einer Entzündung ist somit sehr wahrscheinlich.

Da sich MZ in der Haut auch in räumlicher Nähe zu Blutgefäßen befinden, kann es potentiell zu einer Interaktion mit der Serinprotease Thrombin kommen. Thrombin wird infolge eines Traumas aus dem Zymogen Prothrombin freigesetzt<sup>92</sup>. Dadurch besteht die Möglichkeit der



Aktivierung von PAR exprimierenden Zellen zusätzlich zur Rolle von Thrombin innerhalb der Gerinnungskaskade<sup>101</sup>. Eine Interaktion von Thrombin und MZ bei einem Schlangenbiss ist ebenso denkbar. Da der Schlangenbiss vornehmlich in die Haut erfolgt, könnten MZ eventuell, wie in dieser Arbeit beschrieben, lokal über Thrombin aktiviert werden, was zu einer Degranulation führt. Arbeiten von Metz und Kollegen zeigen, dass die Injektion eines Schlangengifts in MZ-defiziente Mäuse eine Entzündung induziert, die deutlich schneller zum Tod führt als die Injektion der gleichen Dosis in MZ-kompetente Mäuse. Es wurde nachgewiesen, dass ein MZ-Mediator, die Carboxypeptidase (CPA), ein Enzym, das während der Degranulation freigesetzt wird, für den Abbau des Schlangengifts verantwortlich ist<sup>43, 118, 192</sup>. Die Degranulation von MZ durch ein Schlangengift könnte auch auf die Aktivierung der MZ durch Thrombin zurückzuführen sein. Zusätzlich zur ausgelösten Gerinnungskaskade durch die Läsion von Gefäßen und die damit einhergehende Freisetzung von Thrombin können Schlangengifte verschiedener Schlangenarten Zentralasiens unter anderem Prothrombin in Thrombin spalten<sup>226</sup>.

Durch die Lokalisierung der MZ in der Haut sind MZ auch in der Lage mit Nervenzellen zu kommunizieren<sup>227</sup>. Eine Interaktion zwischen MZ und Nerven über Mediatoren wie beispielsweise Substanz P wurde schon in den 1980er Jahren beschrieben<sup>228</sup>. Auch sensorische Nerven exprimieren PAR2. Durch die freigesetzte Tryptase werden sie aktiviert und eine Entzündung begünstigt. Durch die Freisetzung von Substanz P von PAR2 aktivierten Nervenzellen<sup>229</sup> wäre eine feedback Regulierung der MZ möglich, da MZ durch Substanz P aktiviert werden<sup>230</sup>. Die Aktivierung von MZ durch Thrombin über PAR1 und die anschließende Freisetzung von Tryptase könnte somit die Thrombin-induzierte Entzündungsreaktion durch eine Stimulation von Nervenzellen via PAR2 verstärken. 2008 konnten Siebenhaar und Kollegen nachweisen, dass das Fehlen von sensorischen Nerven in der Haut in einem Entzündungsmodell zu einer deutlich verringerten Inflammation führt<sup>183</sup>. 2001 konnten de Garavilla und Kollegen zeigen, dass sensorische Nerven PAR1 exprimieren und die Aktivierung des PAR1 durch Thrombin zu einer Entzündung führt<sup>117</sup>. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass der Juckreiz, den Patienten mit atopischer Dermatitis erleiden, mit einer Erhöhung der Expression von PAR2 auf sensorischen Nerven sowie mit einem erhöhten Level an Tryptase einhergeht. Der Anstieg der Tryptase ist auf eine Degranulation von MZ zurückzuführen<sup>143</sup>. Dieser Befund verdeutlicht eine stark regulierte Interaktion zwischen MZ und den in räumlicher Nähe befindlichen Nerven über die Aktivierung von PAR oder andere sezernierte Mediatoren.

Akute und chronische Entzündungen der Haut sind häufig von einem Juckreiz begleitet, infolgedessen Mikroläsionen ausgebildet werden. Zusätzlich kann es dadurch zu einer

bakteriellen Entzündung der Haut kommen<sup>231, 232</sup>. Sowohl durch Mikroläsionen, die eine lokale Aktivierung des Gerinnungssystems hervorrufen, als auch durch bakterielle Enzyme<sup>233</sup> kann eine lokale Freisetzung von Thrombin ausgelöst werden. Dieses freigesetzte Thrombin könnte wiederum eine Aktivierung der MZ nach sich ziehen, was in einer Sezernierung von Mediatoren resultieren könnte, die die Bekämpfung der bakteriellen Entzündung begünstigen würden und die Reaktion auch wieder beenden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MZ limitierend auf eine Thrombin-induzierte Entzündung wirken können. Bei verschiedenen Infektionen ist dies ebenso der Fall. Die Aktivierung von MZ während einer bakteriellen Entzündung, beispielsweise über TLR<sup>21</sup> oder das Komplementsystem<sup>22</sup>, und die anschließende Sezernierung von MZ-TNF sind wichtig bei der Bekämpfung der Infektion<sup>48</sup>. Während einer bakteriellen Entzündung sezernieren auch die Bakterien verschiedene Enzyme. Diese sind unter anderem in der Lage, Thrombin aus Prothrombin freizusetzen. Dadurch wäre eine Aktivierung der MZ zusätzlich zur oben genannten Aktivierung über TLR möglich. Beispiele für diese Enzyme sind eine von *Staphylococcus aureus* gebildete Metalloprotease<sup>233</sup> oder ein von *Pseudomonas aeruginosa* freigesetztes Enzym<sup>234</sup>. 2007 konnten Siebenhaar und Kollegen nachweisen, dass MZ bei der Bekämpfung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion der Haut von entscheidender Bedeutung sind. Sie konnten zeigen, dass MZ nach der Infektion degranulieren und für die Rekrutierung von Neutrophilen nötig sind, die ihrerseits die Infektion bekämpfen<sup>89</sup>. Der Mechanismus könnte zusätzlich zu dieser MZ-Aktivierung über das bei der bakteriellen Entzündung freigesetzte Thrombin<sup>234</sup> vermittelt sein. Es könnte, wie in dieser Arbeit gezeigt, wiederum eine MZ-Aktivierung hervorrufen, was eine Limitierung der Entzündung zur Folge haben kann. Die Wirkung bzw. Aktivierung von MZ während einer bakteriellen Entzündung gewinnt an Komplexität vor dem Hintergrund, dass die freigesetzten bakteriellen Proteasen einerseits PAR aktivieren<sup>235</sup>, andererseits durch das Schneiden außerhalb der Signalsequenz auch inhibieren können<sup>236</sup>. PAR vermittelte Reaktionen, wie die Freisetzung von Proteasen zur Bekämpfung der bakteriellen Entzündung, würden so unterbunden. Auch bei anderen Infektionen in der Haut bewirken MZ eine verbesserte Abwehr. Die Infektion mit *Leishmania major* können MZ-kompetente Mäuse besser abwehren als MZ-defiziente Mäuse. MZ-defiziente Mäuse weisen größere Läsionen und eine höhere Infektionsrate im Vergleich zur Wildtypkontrolle auf. Ebenso ist die Rekrutierung von Leukozyten gestört, was sich negativ auf den Verlauf der Heilung auswirkt<sup>237</sup>.

Die hier dargestellten Daten verdeutlichen, dass MZ über Thrombin aktiviert werden. Im verwendeten Mausmodell der Ohrschwellung als System zur Analyse einer lokalen Entzündungsreaktion und der Untersuchung dieses Modells in verschiedenen Mausstämmen

---

wurde klare Hinweise dafür gefunden, dass MZ-Mediatoren, besonders die mMCP4, an der Limitierung der Thrombin-vermittelten Entzündung entscheidend beteiligt sind. Aufgrund der Aktivierung via PAR könnten MZ wahrscheinlich in jeder Traumasituation sowie bei der Abwehr von bakteriellen Entzündungen die angeborenen Abwehrmechanismen unterstützen, aber auch limitieren. Die hier gezeigten Daten weisen somit sowohl auf eine Schlüsselposition der MZ während der angeborenen Immunantwort hin, als auch bei der Blutgerinnung und bei der Interaktion mit dem Nervensystem.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von Mastzellen (MZ) durch die Serinprotease Thrombin über Proteinase-aktivierbare Rezeptoren (PAR) untersucht.

Thrombin, ein Schlüsselenzym in der Gerinnungskaskade, wird aus Prothrombin in jeder Traumasituation freigesetzt. Bis heute sind drei verschiedene Thrombinrezeptoren, PAR1, 3, und 4, bekannt, die von verschiedenen Zellpopulationen einschließlich der MZ exprimiert werden. Studien belegen, dass eine Aktivierung der PAR durch Thrombin proinflammatorische Reaktionen auslöst. Charakteristisch für eine aktivierte MZ ist die Sezernierung von inflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise murinen MZ-Proteasen (mMCP) oder Zytokinen und Chemokinen. MZ befinden sich vorzugsweise in der Nähe von Blutgefäßen und sind an Hautentzündungen beteiligt. Um die Effekte von Thrombin auf MZ zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression und Funktion von PAR auf primären murinen MZ analysiert. Dafür wurden *in vitro* verschiedene MZ-Modelle verwendet. 1) knochenmarksgenerierte kultivierte MZ (BMCMC), welche den Schleimhaut-MZ ähneln, 2) peritoneale kultivierte MZ (PCMC) und 3) frisch aus dem Peritoneum isolierte MZ (PMC). Beide ähneln den Bindegewebs-MZ. Zusätzlich wurden die Thrombin-vermittelten Effekte *in vivo* in einem entzündlichen Mausmodell untersucht.

Die quantitative PCR-Analyse von BMCMC und PCMC zeigte die Expression aller drei bekannten Thrombinrezeptoren. Die Stimulation von PMC und PCMC mit Thrombin führte zu einer dosis-abhängigen Degranulation, BMCMC wiesen eine schwache Degranulation auf. Die Inkubation mit spezifischen PAR agonistischen Peptiden (AP) resultierte in einer Degranulation von PMC und PCMC, aber nicht von BMCMC. Zusätzlich führte die Inkubation von PCMC mit Thrombin oder PAR-AP zu einer geringen Sezernierung von Histamin und MCP-1. Die intrakutane Injektion von Thrombin in Ohren von C57BL/6 Mäusen induzierte eine Sofortreaktion einhergehend mit einer starken Ohrschwellung. Die Ohrschwellung in MZ-defizienten C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen war höher als in MZ-kompetenten C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen. Eine lokale Rekonstitution von C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen mit C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* BMCMC normalisierte diesen Effekt. Histologisch wiesen die Ohren von C57BL/6 *Kit<sup>+/+</sup>* Mäusen nach Thrombininjektion eine starke Degranulation der MZ auf. Diese Daten zeigen, dass eine MZ-Degranulation für eine Limitierung der Thrombin-induzierten Entzündungsreaktion nötig sein könnte. Die Inkubation von Thrombin mit Überstand von aktivierten MZ führte zu einer Hemmung der Thrombinaktivität. Die Injektion von Thrombin in Ohren von mMCP4-defizienten C57BL/6 *MCP4<sup>-/-</sup>* Mäusen induzierte einen deutlichen Anstieg der Ohrschwellung im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine MZ-Degranulation durch die Serinprotease Thrombin via PAR-Aktivierung induziert werden kann. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Thrombin-

---

induzierte entzündliche Sofortreaktion durch MZ, zumindest in Teilen durch mMCP4, kontrolliert werden kann.

## 7 SUMMARY

The present work analysed the activation of mast cells (MC) after proteolytic cleavage of proteinase-activated receptors (PAR) by serine proteases like thrombin.

Thrombin, a major player in the coagulation cascade, is cleaved from prothrombin in every trauma situation. Until now 3 different thrombin receptors are known, PAR1, PAR3, and PAR4, which are expressed by different cell populations including MC. Studies revealed that the activation of PAR by thrombin induces proinflammatory effects. MC are characterized by releasing inflammatory mediators like mouse mast cell proteases (mMCP), cytokines, and chemokines, upon activation. They are preferentially localized around blood vessels and critically contribute to skin inflammation. To test the effects of thrombin on MC, the expression and function of PARs on primary murine MC were investigated. For this purpose different *in vitro* models of murine MC were used: 1) Immature bone marrow derived cultured mast cells (BMCMC), which were similar to mucosa type MCs, 2) peritoneal cultured MC (PCMC), and 3) freshly isolated peritoneal MC, both similar to mature connective tissue type MCs. Additionally the effects of thrombin on MC were studied *in vivo* in an inflammatory mouse model.

Quantitative PCR analysis of BMCMC and PCMC displayed expression of all known thrombin receptors in these cell types. Thrombin stimulation resulted in a dose-dependent degranulation of PCMC and PMC but only minor degranulation of BMCMC. Furthermore, incubation with specific PAR agonistic peptides (AP) was followed by degranulation of PCMC but not of BMCMC. Moreover, incubation of PCMC with thrombin or PAR-AP caused a slight release of histamine, TNF and MCP-1. *In vivo* intracutaneous injection of thrombin in ears of C57BL/6 mice induced immediate inflammatory skin reactions associated with a distinct ear swelling. This ear swelling was more pronounced in MC-deficient C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* mice and local reconstitution of C57BL/6 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* mice with C57BL/6 BMCMC normalized this effect. Thrombin injection in ears of C57BL/6 mice resulted in a strong degranulation of MC assessed by quantitative histomorphometry. These data suggest that MC degranulation could be necessary for the limitation of thrombin-induced inflammatory responses. Supporting this thesis, supernatant from activated MC can inhibit thrombin activity. Injecting thrombin in ears of mMCP4-deficient C57BL/6 *MCP4<sup>-/-</sup>* mice, ear swelling was markedly increased ear swelling compared to the corresponding wild type mice.

These findings show that MC degranulation, cytokine and chemokine production can be induced by thrombin via PAR activation. Furthermore thrombin-induced immediate inflammatory skin reactions are controlled by cutaneous MC, at least in part via mMCP4.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ehrlich P. (1877) Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch. mikr. Anat.* 1877;13:263–277. *Arch. mikr. Anat. (Leipzig)*, **13**, 263
2. Ehrlich P. (1879) Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten.
3. Enerbäck L. (1966 a) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effect of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **66**, 289
4. Enerbäck L. (1966 b) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **66**, 303
5. Bienenstock J., Befus A.D., Pearce F., Denburg J. & Goodacre R. (1982) Mast cell heterogeneity: derivation and function, with emphasis on the intestine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **70**, 407.
6. Enerbäck L. (1974) Ultrastructure of mucosal mast cells in normal and compound 48-80-treated rats. *Cell and Tissue Research*, **150**, 95
7. Razin E., Stevens R.L., Akiyama F., Schmid K. & Austen K.F. (1982) Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate. *Journal of Biological Chemistry* **257** 7229.
8. Sredni B., Friedman M., Bland C. & Metcalfe D. (1983) Ultrastructural, biochemical, and functional characteristics of histamine-containing cells cloned from mouse bone marrow: tentative identification as mucosal mast cells *The Journal of Immunology* **131** 915.
9. Levi-Schaffer F., Austen K.F., Gravalles P.M. & Stevens R.L. (1986) Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**, 6485.
10. Rothenberg M.E. & Austen F.K. (1989) Influence of the Fibroblast Environment on the Structure of Mast Cell Proteoglycans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **556**, 233.
11. Pejler G., Åbrink M., Ringvall M. & Wernersson S. (2007) Mast Cell Proteases. *Advances in Immunology*. Volume 95 edn, p. 167. Academic Press.
12. Kirshenbaum A., Kessler S., Goff J. & Metcalfe D. (1991) Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells *The Journal of Immunology* **146** 1410.
13. Kitamura Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annual Review of Immunology*, **7**, 59.
14. Jarboe D. & Huff T. (1989) The mast cell-committed progenitor. II. W/Wv mice do not make mast cell-committed progenitors and S1/S1d fibroblasts do not support development of normal mast cell-committed progenitors *The Journal of Immunology* **142** 2418.
15. Anderson D.M., Lyman S.D., Baird A., Wignall J.M., Eisenman J., Rauch C., March C.J., Boswell H.S., Gimpel S.D., Cosman D. & Williams D.E. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, **63**, 235.
16. Tsai M., Takeishi T., Thompson H., Langley K.E., Zsebo K.M., Metcalfe D.D., Geissler E.N. & Galli S.J. (1991) Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 6382.
17. Taylor AM G.S., Coleman JW. (1995) Stem-cell factor, the kit ligand, induces direct degranulation of rat peritoneal mast cells in vitro and in vivo: dependence of the in vitro effect on period of culture and comparisons of stem-cell factor with other mast cell-activating agents. *Immunology*, **86**, 427.
18. Meininger C., Yano H., Rottapel R., Bernstein A., Zsebo K. & Zetter B. (1992) The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood*, **79**, 958.

19. Bach M.K. & Brashler J.R. (1973 ) On the Nature of the Presumed Receptor for IgE on Mast Cells *The Journal of Immunology* **111** 324.
20. Galli S.J. (1989) Mast cells: immunologically specific effectors and potential sources of multiple cytokines during IgE-dependent responses. *Ciba Found Symposium*, **147**, 53.
21. Volaluck S., Hiroko, U., Atsuhito, N., Shizuo, A., Ko, O., Chisei, Ra, Hideoki, O. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, **109**, 1351
22. Prodeus A.P., Zhou X., Maurer M., Galli S.J. & Carroll M.C. (1997) Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature*, **390**, 172.
23. Bischoff S., Sellge G., Lorentz A., Sebald W., Raab R. & Manns M. (1999) IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 8080.
24. Paus R., Heinzelmann T., Robicsek S., Czarnetzki B. & Maurer M. (1995) Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. *Archives of dermatological research*, **287**, 500.
25. Razin E. & Marx G. (1984 ) Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells *The Journal of Immunology* **133** 3282.
26. Metcalfe D.D., Baram D. & Mekori Y.A. (1997 ) Mast cells *Physiological Reviews* **77** 1033.
27. Galli S.J., Kalesnikoff J., Grimbaldston M.A., Piliponsky A.M., Williams C.M.M. & Tsai M. (2005) Mast cells as tunable effector and immunoregulatory cells. *Annual Review of Immunology*, **23**, 749.
28. Gurish M., Ghildyal N., Arm J., Austen K., Avraham S., Reynolds D. & Stevens R. (1991 ) Cytokine mRNA are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation *The Journal of Immunology* **146** 1527.
29. Leal-Berumen I., Conlon P. & Marshall J. (1994 ) IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide *The Journal of Immunology* **152** 5468.
30. Metz M. & Maurer M. (2007) Mast cells - key effector cells in immune responses. *Trends in Immunology*, **28**, 234.
31. Weber A., Knop J. & Maurer M. (2003) Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *British Journal of Dermatology*, **148**, 224.
32. Henz B.M., Maurer M., Lippert U., Worm M. & Babina M. (2001) Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Experimental Dermatology*, **10**, 1.
33. Malaviya R. & Abraham S.N. (2001) Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunological Reviews*, **179**, 16.
34. Malaviya R. & Georges A. (2002) Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. In: *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, Vol. 22, p. 189. Humana Press Inc.
35. Walsh L.J., Trinchieri G., Waldorf H.A., Whitaker D. & Murphy G.F. (1991 ) Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** 4220.
36. Miki I., Kusano A., Ohta S., Hanai N., Otoshi M., Masaki S., Sato S. & Ohmori K. (1996) Histamine Enhanced the TNF-[alpha]-Induced Expression of E-Selectin and ICAM-1 on Vascular Endothelial Cells. *Cellular Immunology*, **171**, 285.
37. von Stebut E., Metz M., Milon G., Knop J. & Maurer M. (2003) Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood*, **101**, 210.
38. Egozi E.I., Ferreira A.M., Burns A.L., Gamelli R.L. & Dipietro L.A. (2003) Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair and Regeneration*, **11**, 46.



39. Martin P. & Leibovich S.J. (2005) Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, **15**, 599.
40. Blair R., Meng H., Marchese M., Ren S., Schwartz L., Tonnesen M. & Gruber B. (1997) Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *The Journal of Clinical Investigation*, **99**, 2691
41. Hiromatsu Y. & Toda S. (2003) Mast cells and angiogenesis. *Microscopy Research and Technique*, **60**, 64.
42. Maurer M., Wedemeyer J., Metz M., Piliponsky A.M., Weller K., Chatterjea D., Clouthier D.E., Yanagisawa M.M., Tsai M. & Galli S.J. (2004) Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. **432**, 512.
43. Metz M., Piliponsky A.M., Chen C.-C., Lammel V., Åbrink M., Pejler G., Tsai M. & Galli S.J. (2006) Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms. *Science*, **313**, 526.
44. Varadaradjalou S., Feger F., Thieblemont N., Hamouda N.B., Pleau J.-M., Dy M. & Arock M. (2003) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *European Journal of Immunology*, **33**, 899.
45. Malaviya R., Gao Z., Thankavel K., van der Merwe P.A. & Abraham S.N. (1999 ) The mast cell tumor necrosis factor  $\hat{\pm}$  response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 8110.
46. Malaviya R., Ikeda T., Ross E. & Abraham S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-[alpha]. *Nature*, **381**, 77.
47. El-Lati S.G., Dahinden C.A. & Church M.K. (1994) Complement Peptides C3a- and C5a-Induced Mediator Release from Dissociated Human Skin Mast Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, **102**, 803.
48. Echtenacher B., Mannel D.N. & Hultner L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **381**, 75.
49. Eady R., Cowen T., Marshall T.F., Plummer V. & Greaves M.W. (1979) Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *British Journal of Dermatology*, **100**, 623.
50. Weller K., Foitzik K., Paus R., Syska W. & Maurer M. (2006) Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *The FASEB Journal*, **20**, 2366.
51. Meininger CJ Z.B. (1992) Mast cells and angiogenesis. *Seminars in cancer biology*, **3**, 73.
52. Sörbo J J.A., Norrby K. (1994) Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine1 and histamine2. *International journal of experimental pathology*, **75**, 43.
53. Jakobsson A.E. (1994) Angiogenesis Induced by Mast Cell Secretion in Rat Peritoneal Connective Tissue Is a Process of Three Phases. *Microvascular Research*, **47**, 252.
54. Detoraki A., Staiano R.I., Granata F., Giannattasio G., Prevete N., de Paulis A., Ribatti D., Genovese A., Triggiani M. & Marone G. (2009) Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **123**, 1142.
55. Compton S.J., Cairns J.A., Holgate S.T. & Walls A.F. (1998 ) The Role of Mast Cell Tryptase in Regulating Endothelial Cell Proliferation, Cytokine Release, and Adhesion Molecule Expression: Tryptase Induces Expression of mRNA for IL-1 $\hat{\gamma}$  and IL-8 and Stimulates the Selective Release of IL-8 from Human Umbilical Vein Endothelial Cells *The Journal of Immunology* **161** 1939.
56. Castellani M.L., Shaik Y.B., Perrella A., Frydas S., Simeonidou I., Salini V., Tet $\hat{\alpha}$  S., Conti C.M., Vecchiet J., Theoharides T.C., Conti P. & De Lutiis M.A. (2007) Expression and Secretion of CXCL8 (IL-8), Release of Tryptase and Transcription of Histidine Decarboxylase mRNA by Anti-IgE-Activated Human Umbilical Cord Blood-Derived Cultured Mast Cells. *Neuroimmunomodulation*, **14**, 97.
57. Fox C.C., Jewell S.D. & Whitacre C.C. (1994) Rat Peritoneal Mast Cells Present Antigen to a PPD-Specific T Cell Line. *Cellular Immunology*, **158**, 253.

58. Inamura N., Mekori Y.A., Bhattacharyya S.P., Bianchine P.J. & Metcalfe D.D. (1998 ) Induction and Enhancement of Fc $\mu$ RI-Dependent Mast Cell Degranulation Following Coculture with Activated T Cells: Dependency on ICAM-1- and Leukocyte Function-Associated Antigen (LFA)-1-Mediated Heterotypic Aggregation *The Journal of Immunology* **160** 4026.
59. Malaviya R., Twesten N., Ross E., Abraham S. & Pfeifer J. (1996 ) Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells *The Journal of Immunology* **156** 1490.
60. Nakae S., Suto H., Iikura M., Kakurai M., Sedgwick J.D., Tsai M. & Galli S.J. (2006 ) Mast Cells Enhance T Cell Activation: Importance of Mast Cell Costimulatory Molecules and Secreted TNF *The Journal of Immunology* **176** 2238.
61. Nagao K., Yokoro K. & Aaronson S.A. (1981) Continuous Lines of Basophil/Mast Cells Derived from Normal Mouse Bone Marrow. *Science*, **212**, 333.
62. Daëron M., Duc H.T., Kanellopoulos J., Le Bouteiller P., Kinsky R. & Voisin G.A. (1975) Allogeneic mast cell degranulation induced by histocompatibility antibodies: An in vitro model of transplantation anaphylaxis. *Cellular Immunology*, **20**, 133.
63. Malbec O., Roget K., Schiffer C.c., Iannascoli B., Dumas A.R., Arock M. & DaÅ«ron M. (2007) Peritoneal Cell-Derived Mast Cells: An In Vitro Model of Mature Serosal-Type Mouse Mast Cells. *The Journal of Immunology*, **178**, 6465.
64. Metz M., Botchkarev V.A., Botchkareva N.V., Welker P., Tobin D.J., Knop J.r., Maurer M. & Paus R. (2004) Neurotrophin-3 regulates mast cell functions in neonatal mouse skin. *Experimental Dermatology*, **13**, 273.
65. Razin E., Ihle J., Seldin D., Mencia-Huerta J., Katz H., LeBlanc P., Hein A., Caulfield J., Austen K. & Stevens R. (1984 ) Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan *The Journal of Immunology* **132** 1479.
66. Tsai M., Shih L.-S., Newland G.F., Takeishi T., Langley K.E., Zsebo K.M., Miller H.R., Geissler E.N. & Galli S.J. (1991) The Rat c-kit Ligand, Stem Cell Factor, Induces the Development of Connective Tissue-type and Mucosal Mast Cells In Viva Analysis by Anatomical Distribution, Histochemistry, and Protease Phenotype. *Journal of Experimental Medicine*, **174**, 125.
67. Gurish M., Ghildyal N., McNeil H., Austen K., Gillis S. & Stevens R. (1992) Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *Journal of Experimental Medicine*, **175**, 1003.
68. Kitamura Y., Go S. & Hatanaka K. (1978) Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, **52**, 447.
69. Nocka K., Tan J.C., Chiu E., Chu T.Y., Ray P., Traktman P. & Besmer P. (1990) Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *The EMBO Journal*, **9**, 1805.
70. Nocka K., Majumder S., Chabot B., Ray P., Cervone M., Bernstein A. & Besmer P. (1989) Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & development*, **3**, 816.
71. Nocka K M.S., Chabot B, Ray P, Cervone M, Bernstein A, Besmer P (1989) Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & development*, **3**, 816.
72. Kitamura S.J.G.a.Y. (1987) Genetically mast-cell-deficient W/Wv and Sl/Sl mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *The American Journal of Pathology*, **127**, 191.
73. Tono T., Tsujimura T., Koshimizu U., Kasugai T., Adachi S., Isozaki K., Nishikawa S., Morimoto M., Nishimune Y. & Nomura S. (1992) c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell- deficient Wsh/Wsh mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood*, **80**, 1448.
74. Lyon MF & Glenister P. (1982) A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genetical research*, **39**, 315.

75. Grimbaldston M.A., Chen C.-C., Piliponsky A.M., Tsai M., Tam S.-Y. & Galli S.J. (2005) Mast Cell-Deficient W-sash c-kit Mutant Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo. *Am J Pathol*, **167**, 835.
76. Nigrovic P.A., Gray D.H.D., Jones T., Hallgren J., Kuo F.C., Chaletzky B., Gurish M., Mathis D., Benoist C. & Lee D.M. (2008) Genetic Inversion in Mast Cell-Deficient Wsh Mice Interrupts Corin and Manifests as Hematopoietic and Cardiac Aberrancy. *The American Journal of Pathology*, **173**, 1693.
77. Knight P.A., Wright S.H., Lawrence C.E., Paterson Y.Y.W. & Miller H.R.P. (2000) Delayed Expulsion of the Nematode *Trichinella spiralis* in Mice Lacking the Mucosal Mast Cell Specific Granule Chymase, Mouse Mast Cell Protease-1. *The Journal of Experimental Medicine*, **192**, 1849.
78. Tchougounova E., Pejler G. & Åbrink M. (2003) The Chymase, Mouse Mast Cell Protease 4, Constitutes the Major Chymotrypsin-like Activity in Peritoneum and Ear Tissue. A Role for Mouse Mast Cell Protease 4 in Thrombin Regulation and Fibronectin Turnover. *The Journal of Experimental Medicine*, **198**, 423.
79. Abonia J.P., Friend D.S., Austen W.G., Moore F.D., Carroll M.C., Chan R., Afran J., Humbles A., Gerard C., Knight P., Kanaoka Y., Yasuda S., Morokawa N., Austen K.F., Stevens R.L. & Gurish M.F. (2005) Mast Cell Protease 5 Mediates Ischemia-Reperfusion Injury of Mouse Skeletal Muscle *The Journal of Immunology* **174** 7285.
80. Feyerabend T.B., Hausser H., Tietz A., Blum C., Hellman L., Straus A.H., Takahashi H.K., Morgan E.S., Dvorak A.M., Fehling H.J. & Rodewald H.-R. (2005) Loss of Histochemical Identity in Mast Cells Lacking Carboxypeptidase A. *Molecular and Cell Biology*, **25**, 6199.
81. Huang C., Friend D.S., Qiu W.-T., Wong G.W., Morales G., Hunt J. & Stevens R.L. (1998) Induction of a Selective and Persistent Extravasation of Neutrophils into the Peritoneal Cavity by Tryptase Mouse Mast Cell Protease 6 *The Journal of Immunology* **160** 1910.
82. Algermissen B., Hermes B., Feldmann-Boeddeker I., Bauer F. & Henz B.M. (1999) Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Experimental Dermatology*, **8**, 193.
83. Tchougounova E., Lundquist A., Fajardo I., Winberg J.-O., Åbrink M. & Pejler G. (2005) A Key Role for Mast Cell Chymase in the Activation of Pro-matrix Metalloprotease-9 and Pro-matrix Metalloprotease-2. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 9291.
84. Wolters P.J., Clair J.M.-S., Lewis C.C., Villalta S.A., Baluk P., Erle D.J. & Caughey G.H. (2005) Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit<sup>W-sh/Kit<sup>W-sh</sup></sup> sash mice. *Clinical & Experimental Allergy*, **35**, 82.
85. Chi E. & Lagunoff D. (1975) Abnormal mast cell granules in the beige (Chediak-Higashi syndrome) mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 117.
86. Kitamura Y., Shimada M., Hatanaka K. & Miyano Y. (1977) Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. **268**, 442.
87. Nakano T. (1985) Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *Journal of Experimental Medicine*, **162**, 1025
88. Maurer M., Echtenacher B., Hültner L., Kollias G., Männel D.N., Langley K.E. & Galli S.J. (1998) The c-kit Ligand, Stem Cell Factor, Can Enhance Innate Immunity Through Effects on Mast Cells. *Journal of Experimental Medicine*, **188**, 2343.
89. Siebenhaar F., Syska W., Weller K., Magerl M., Zuberbier T., Metz M. & Maurer M. (2007) Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. *American Journal of Pathology*, **170**, 1910.
90. Hochegger K., Siebenhaar F., Vielhauer V., Heininger D., Mayadas T.N., Mayer G., Maurer M. & Rosenkranz A.R. (2005) Role of mast cells in experimental anti-

- glomerular basement membrane glomerulonephritis. *European Journal of Immunology*, **35**, 3074.
91. Tracy P.B., Nesheim M.E. & Mann K.G. (1981 ) Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. . *Journal of Biological Chemistry* **256** 743.
92. Lippi G. & Cervellin G. (2010) Disseminated Intravascular Coagulation in Trauma Injuries. *Semin Thromb Hemost*, **36**, 378.
93. Blomback B., Hogg D.H., Gårdlund B., Hessel B. & Kudryk B. (1976) Fibrinogen and fibrin formation. *Thrombosis Research*, **8**, 329.
94. White A. & Heptinstall S. (1978) Contribution of platelets to thrombus formation. *British Medical Bulletin*, **34**, 123.
95. Griffith M.J., Noyes C.M. & Church F.C. (1985 ) Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III. . *Journal of Biological Chemistry* **260** 2218.
96. Jensen P.E. & Sottrup-Jensen L. (1986 ) Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. Complete disulfide bridge assignment and localization of two interchain bridges in the dimeric proteinase binding unit. . *Journal of Biological Chemistry* **261** 15863.
97. Tollefsen D.M., Majerus D.W. & Blank M.K. (1982 ) Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. . *Journal of Biological Chemistry* **257** 2162.
98. Heeb M.J. & Griffin J.H. (1988 ) Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. . *Journal of Biological Chemistry* **263** 11613.
99. Esmon N.L. (1987) Thrombomodulin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **13**, 454.
100. Vu T.-K.H., Hung D.T., Wheaton V.I. & Coughlin S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, **64**, 1057.
101. Coughlin S.R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. **407**, 258.
102. Hirano K. (2007) The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 27.
103. Shpacovitch V., Feld M., Hollenberg M.D., Luger T.A. & Steinhoff M. (2008) Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, **83**, 1309.
104. Connolly A.J., Ishihara H., Kahn M.L., Farese R.V. & Coughlin S.R. (1996) Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. **381**, 516.
105. Ishihara H., Connolly A.J., Zeng D., Kahn M.L., Wu Zheng Y., Timmons C., Tram T. & Coughlin S.R. (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. **386**, 502.
106. Xu W.-f., Andersen H., Whitmore T.E., Presnell S.R., Yee D.P., Ching A., Gilbert T., Davie E.W. & Foster D.C. (1998 ) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 6642.
107. D'Andrea M.R., Rogahn C.J. & Andrade-Gordon P. (2000) Localization of Protease-Activated Receptors -1 and -2 in Human Mast Cells: Indications for an Amplified Mast Cell Degranulation Cascade. *Biotechnic & Histochemistry*, **75**, 85.
108. Santulli R.J., Derian C.K., Darrow A.L., Tomko K.A., Eckardt A.J., Seiberg M., Scarborough R.M. & Andrade-Gordon P. (1995 ) Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** 9151.
109. Michel D. & Harmand M.-F. (1990) Fibrin seal in wound healing: Effect of thrombin and [Ca<sup>2+</sup>] on human skin fibroblast growth and collagen production. *Journal of Dermatological Science*, **1**, 325.
110. Weinstein J., Gold S., Cunningham D. & Gall C. (1995) Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.*, **15**, 2906.

111. Moormann C., Artuc M., Pohl E., Varga G., Buddenkotte J., Vergnolle N., Brehler R., Henz B.M., Schneider S.W., Luger T.A. & Steinhoff M. (2006) Functional Characterization and Expression Analysis of the Proteinase-Activated Receptor-2 in Human Cutaneous Mast Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, **126**, 746.
112. Gordon J.R., Zhang X., Stevenson K. & Cosford K. (2000) Thrombin Induces IL-6 but Not TNF[alpha] Secretion by Mouse Mast Cells: Threshold-Level Thrombin Receptor and Very Low Level Fc[epsilon]RI Signaling Synergistically Enhance IL-6 Secretion. *Cellular Immunology*, **205**, 128.
113. Zetter B.R., Chen L.B. & Buchanan J.M. (1976) Effects of protease treatment on growth, morphology, adhesion, and cell surface proteins of secondary chick embryo fibroblasts. *Cell*, **7**, 407.
114. Deng X., Mercer P.F., Scotton C.J., Gilchrist A. & Chambers R.C. (2008) Thrombin Induces Fibroblast CCL2/JE Production and Release via Coupling of PAR1 to G{alpha}q and Cooperation between ERK1/2 and Rho Kinase Signaling Pathways. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2520.
115. Snider RM R.E. (1983) Thrombin stimulation of guanosine 3',5'-monophosphate formation in murine neuroblastoma cells (clone N1E-115). *Science*, **221**, 566.
116. Cunningham D.D. & Gurwitz D. (1989) Proteolytic regulation of neurite outgrowth from neuroblastoma cells by thrombin and protease nexin-1. *Journal of Cellular Biochemistry*, **39**, 55.
117. de Garavilla L., Vergnolle N., Young S.H., Ennes H., Steinhoff M., Ossovskaya V.S., D'Andrea M.R., Mayer E.A., Wallace J.L., Hollenberg M.D., Andrade-Gordon P. & Bunnett N.W. (2001) Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *British Journal of Pharmacology*, **133**, 975
118. Sugama Y., Tiruppathi C., Janakidevi K., Andersen T.T., Fenton J.W. & Malik A.B. (1992) Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *Journal of Cell Biology*, **119**, 935.
119. Malik A. & Fenton J.n. (1992) Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **18**, 193.
120. Colotta F., Sciacca F., Sironi M., Luini W., Rabiet M. & Mantovani A. (1994) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *The American Journal of Pathology*, **144**, 975.
121. Blackburn J. (2008) Matrix Metalloproteinase-1 and Thrombin Differentially Activate Gene Expression in Endothelial Cells via PAR-1 and Promote Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, **173**, 1763
122. Vu T.-K.H., Wheaton V.I., Hung D.T., Charo I. & Coughlin S.R. (1991) Domains specifying thrombin-receptor interaction. **353**, 674.
123. Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C. & Sundelin J. (1994 ) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** 9208.
124. Nystedt S., Larsson A.-K., Å...berg H. & Sundelin J. (1995) The Mouse Proteinase-activated Receptor-2 cDNA and Gene. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 5950.
125. Nakanishi-Matsui M., Zheng Y.-W., Sulciner D.J., Weiss E.J., Ludeman M.J. & Coughlin S.R. (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, **404**, 609.
126. Hollenberg M.D. (2003) Proteinase-mediated signaling: Proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sciences*, **74**, 237.
127. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T.A. & Hollenberg M.D. (2005) Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocrine Review*, **26**, 1.
128. Yousef G.M., Elliott M.B., Kopolovic A.D., Serry E. & Diamandis E.P. (2004) Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, **1698**, 77.

129. Molino M., Barnathan E.S., Numerof R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J.A., Schechter N., Woolkalis M. & Brass L.F. (1997) Interactions of Mast Cell Tryptase with Thrombin Receptors and PAR-2. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 4043.
130. Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F. & Hwang J.K. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry*, **28**, 3629.
131. Camerer E., Huang W. & Coughlin S.R. (2000) Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** 5255.
132. Déry O., Corvera C.U., Steinhoff M. & Bunnett N.W. (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **274**, C1429.
133. Verrall S., Ishii M., Chen M., Wang L., Tram T. & Coughlin S.R. (1997) The Thrombin Receptor Second Cytoplasmic Loop Confers Coupling to Gq-like G Proteins in Chimeric Receptors. ADDITIONAL EVIDENCE FOR A COMMON TRANSMEMBRANE SIGNALING AND G PROTEIN COUPLING MECHANISM IN G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 6898.
134. Trejo J. (2003) Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **307**, 437.
135. Molino M., Blanchard N., Belmonte E., Tarver A., Abrams C., Hoxie J., Cerletti C. & Brass L. (1995) Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 11168.
136. Loew D., Perrault C., Morales M., Moog S., Ravanat C., Schuhler S., Arcone R., Pietropaolo C., Cazenave J.-P., van Dorsselaer A. & Lanza F. (2000) Proteolysis of the Exodomain of Recombinant Protease-Activated Receptors: Prediction of Receptor Activation or Inactivation by MALDI Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **39**, 10812.
137. Hollenberg M.D. & Compton S.J. (2002) International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews*, **54**, 203.
138. Yang Y.H., Hall P., Little C.B., Fosang A.J., Milenkovski G., Santos L., Xue J., Tipping P. & Morand E.F. (2005) Reduction of arthritis severity in protease-activated receptor deficient mice. *Arthritis & Rheumatism*, **52**, 1325.
139. Martin L., Augé C., Boué J., Buresi M.C., Chapman K., Asfaha S., Andrade-Gordon P., Steinhoff M., Cenac N., Dietrich G. & Vergnolle N. (2009) Thrombin receptor: An endogenous inhibitor of inflammatory pain, activating opioid pathways. *Pain*, **146**, 121.
140. He S.-h., Xie H. & Fu Y.-l. (2005) Activation of human tonsil and skin mast cells by agonists of proteinase activated receptor-2. **26**, 568.
141. Shpacovitch V.M., Varga G., Strey A., Gunzer M., Mooren F., Buddenkotte J., Vergnolle N., Sommerhoff C.P., Grabbe S., Gerke V., Homey B., Hollenberg M., Luger T.A. & Steinhoff M. (2004) Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *Journal of Leukocyte Biology*, **76**, 388.
142. Steinhoff M., Corvera C.U., Thoma M.S., Kong W., McAlpine B.E., Caughey G.H., Ansel J.C. & Bunnett N.W. (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Experimental Dermatology*, **8**, 282.
143. Seeliger S., Derian C.K., Vergnolle N., Bunnett N.W., Nawroth R., Schmelz M., von der Weis P.-Y., Buddenkotte J., Sunderkötter C., Metze D., Andrade-Gordon P., Harms E., Vestweber D., Luger T.A. & Steinhoff M. (2003) Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *The FASEB Journal*, **17**, 1871.

144. Ishihara H., Zeng D., Connolly A.J., Tam C. & Coughlin S.R. (1998) Antibodies to Proteinase-Activated Receptor 3 Inhibit Activation of Mouse Platelets by Thrombin. *Blood*, **91**, 4152.
145. Weiss E.J., Hamilton J.R., Lease K.E. & Coughlin S.R. (2002) Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood*, **100**, November 1.
146. Kahn M.L., Zheng Y.-W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R.V., Tam C. & Coughlin S.R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Blood*, **394**, 690.
147. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D. & Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Science*, **389**, 816.
148. Vellani V., Kinsey A.M., Prandini M., Hechtfisher S.C., Reeh P., Magherini P.C., Giacomoni C. & McNaughton P.A. (2010) Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Molecular Pain*, **6**.
149. Mao Y., Zhang M., Tuma R.F. & Kunapuli S.P. (2010) Deficiency of PAR4 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **30**, 1044.
150. Vergnolle N., Derian C.K., D'Andrea M.R., Steinhoff M. & Andrade-Gordon P. (2002) Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: A Potential Proinflammatory Role for Proteinase-Activated Receptor-4. *The Journal of Immunology*, **169**, 1467.
151. Barry G.D., Le G.T. & Fairlie D.P. (2006) Agonists and Antagonists of Protease Activated Receptors (PARs). *Current Medicinal Chemistry*, **13**, 243.
152. Rahman A., True A.L., Anwar K.N., Ye R.D., Voyno-Yasenetskaya T.A. & Malik A.B. (2002) G $\alpha_q$  and G $\beta\gamma$  Regulate PAR-1 Signaling of Thrombin-Induced NF- $\kappa$ B Activation and ICAM-1 Transcription in Endothelial Cells. *Circ Res*, **91**, 398.
153. Vogel S.M., Xiaopei G., Dolly M., Ye R.D., John T.A., Andrade-Gordon P., Triuppathi C. & Malik A.B. (2000) Abrogation of thrombin-induced increase in pulmonary microvascular permeability in PAR-1 knockout mice. *Physiological Genomics*, **4**, 137.
154. Ando S., Otani H., Yagi Y., Kawai K., Araki H., Fukuhara S. & Inagaki C. (2007) Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respiratory Research*, **8**.
155. Faruqi T.R., Weiss E.J., Shapiro M.J., Huang W. & Coughlin S.R. (2000) Structure-Function Analysis of Protease-activated Receptor 4 Tethered Ligand Peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 19728.
156. McDougall J.J., Zhang C., Cellars L., Joubert E., Dixon C.M. & Vergnolle N. (2009) Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis & Rheumatism*, **60**, 728.
157. Bernatowicz M.S., Klimas C.E., Hartl K.S., Peluso M., Allegretto N.J. & Seiler S.M. (1996) Development of Potent Thrombin Receptor Antagonist Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **39**, 4879.
158. Ahn H.-S., Arik L., Boykow G., Burnett D.A., Caplen M.A., Czarniecki M., Domalski M.S., Foster C., Manna M., Stamford A.W. & Wu Y. (1999) Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**, 2073.
159. Ahn H.-S., Foster C., Boykow G., Stamford A., Manna M. & Graziano M. (2000) Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1425.
160. Hollenberg M.D. & Saifedine M. (2001) Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): activation and inhibition of rat platelet aggregation by PAR4-derived peptides. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, **79**, 439.

- 
161. Ma L., Hollenberg M.D. & Wallace J.L. (2001) Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor-4 (PAR4) antagonist. *British Journal of Pharmacology*, **134**, 701.
162. Strande J.L., Hsu A., Su J., Fu X., Gross G.J. & Baker J.E. (2008) Inhibiting Protease-Activated Receptor 4 Limits Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts by Unmasking Adenosine Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324**, 1045.
163. Kimura I., Moritani Y. & Tanzaki Y. (1973) Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clinical Allergy*, **3**, 195.
164. Metz M., Lammel V., Gibbs B.F. & Maurer M. (2006) Inflammatory Murine Skin Responses to UV-B Light Are Partially Dependent on Endothelin-1 and Mast Cells. *American Journal of Pathology*, **169**, 815.
165. Saiki RK G.D., Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487.
166. Wershil B., Murakami T. & Galli S. (1988 ) Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. Mast cells are required for the full expression of cutaneous acute inflammation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate *The Journal of Immunology* **140** 2356.
167. Dvorak A., Tepper R., Weller P., Morgan E., Estrella P., Monahan-Earley R. & Galli S. (1994) Piecemeal Degranulation of Mast Cells in the Inflammatory Eyelid Lesions of Interleukin-4 Transgenic Mice. Evidence of Mast Cell Histamine Release In Vivo by Diamine Oxidase-Gold Enzyme-Affinity Ultrastructural Cytochemistry. *Blood*, **83**, 3600.
168. Serafin W.E., Sullivan T.P., Conder G.A., Ebrahimi A., Marcham P., Johnson S.S., Austen K.F. & Reynolds D.S. (1991 ) Cloning of the cDNA and gene for mouse mast cell protease 4. Demonstration of its late transcription in mast cell subclasses and analysis of its homology to subclass-specific neutral proteases of the mouse and rat. . *Journal of Biological Chemistry* **266** 1934.
169. Zhang H., Yang H. & He S.-h. (2010) TNF increases expression of IL-4 and PARs in mast cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **26**, 327.
170. Nishikawa H., Kawabata A., Kuroda R., Nishida M. & Kawai K. (2000) Characterization of Protease-Activated Receptors in Rat Peritoneal Mast Cells. *Japanese Journal of Pharmacology*, **82**, 74.
171. Stenton G., Nohara O., Déry R., Vliagoftis H., Gilchrist M., Johri A., Wallace J., Hollenberg M., Moqbel R. & Befus A. (2002) Proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR-1 and PAR-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **302**, 466.
172. Dugina T.N., Kiseleva E.V., Glusa E. & Strukova S.M. (2003) Activation of mast cells induced by agonists of proteinase-activated receptors under normal conditions and during acute inflammation in rats. *European Journal of Pharmacology*, **471**, 141.
173. Hollenberg M.D., Yang S.G., Laniyonu A.A., Moore G.J. & Saifeddine M. (1992 ) Action of thrombin receptor polypeptide in gastric smooth muscle: identification of a core pentapeptide retaining full thrombin-mimetic intrinsic activity. . *Molecular Pharmacology* **42** 186.
174. Al-Ani B., Saifeddine M., Kawabata A., Renaux B., Mokashi S. & Hollenberg M.D. (1999) Proteinase-Activated Receptor 2 (PAR2): Development of a Ligand-Binding Assay Correlating with Activation of PAR2 by PAR1- and PAR2-Derived Peptide Ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **290**, 753.
175. Di Serio C., Pellerito S., Duarte M., Massi D., Naldini A., Cirino G., Prudovsky I., Santucci M., Geppetti P., Marchionni N., Masotti G. & Tarantini F. (2007) Protease-Activated Receptor 1-Selective Antagonist SCH79797 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis by a Protease-Activated Receptor 1-Independent Mechanism. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **101**, 63.



176. Nakano T., Kanakura Y., Hidekazu A. & Kitamura Y. (1987) Changing Processes from Bone Marrow-derived cultured Mast Cells to the connective tissue-type mast cells in the peritoneal cavity of mast cell-deficient w/wv mice: association of proliferation arrest and differentiation. *The Journal of Immunology*, **138**, 544.
177. Riley J.F. & West G.B. (1953 ) The presence of histamine in tissue mast cells *The Journal of Physiology* **120** 528.
178. Prouvost-Danon A., Silva Lima M. & Queiroz Javierre M. (1966) Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cells. *Life Sciences*, **5**, 289.
179. Strukova S., Dugina T., Khlgatian S., Redkozubov A., Redkozubova G. & Pinelis V. (1996) Thrombin-Mediated Events Implicated in Mast Cell Activation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **22**, 145.
180. Nakayama T., Mutsuga N., Yao L. & Tosato G. (2006) Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **79**, 95.
181. Oliveira S.H.P. & Lukacs N.W. (2000) Stem cell factor and IgE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflammation research*, **50**, 168.
182. Schmidt-Choudhury A., Furuta G.T., Galli S.J., Schmidt W.E. & Wershil B.K. (1999) Mast cells contribute to PACAP-induced dermal oedema in mice. *Regulatory Peptides*, **82**, 65.
183. Siebenhaar F., Magerl M., Peters E.M.J., Hendrix S., Metz M. & Maurer M. (2008) Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **121**, 955.
184. Schouten B., van Esch B.C.A.M., Hofman G.A., van den Elsen L.W.J., Willemsen L.E.M. & Garssen J. (2008) Acute Allergic Skin Reactions and Intestinal Contractility Changes in Mice Orally Sensitized against Casein or Whey. *International Archives of Allergy and Immunology*, **147**, 125.
185. Watanabe H., Unger M., Tuvel B., Wang B. & Sauder D.N. (2002) Review: Contact Hypersensitivity: The Mechanism of Immune Responses and T Cell Balance. *Journal of Interferon & Cytokine Research.*, **22**, 407.
186. Saint-Mezard P., Bérand F., Dubios B., Kaiserlian D. & Nicolas J.-F. (2004) The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *European Journal of Dermatology*, **14**, 131.
187. Grabbe S. & Schwarz T. (1998) Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunology Today*, **19**, 37.
188. Bour H.I.n., Peyron E., Gaucherand M., Garrigue J.-L., Desvignes C., Kaiserlian D., Revillard J.-P. & Nicolas J.-F.o. (1995) Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *European Journal of Immunology*, **25**, 3006.
189. Wang B., Fujisawa H., Zhuang L., Freed I., Howell B.G., Shahid S., Shivji G.M., Mak T.W. & Sauder D.N. (2000 ) CD4+ Th1 and CD8+ Type 1 Cytotoxic T Cells Both Play a Crucial Role in the Full Development of Contact Hypersensitivity *The Journal of Immunology* **165** 6783.
190. Galli S.J. & Tsai M. (2008) Mast cells: Versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of Dermatological Science*, **49**, 7.
191. Tsai M., Grimaldeston M., Yu M., Tam S. & Galli S. (2005) Using mast cell knock-in mice to analyze the roles of mast cells in allergic responses in vivo. *Chemical immunology and allergy*, **87**, 179.
192. Schneider L.A., Schlenner S.M., Feyerabend T.B., Wunerlin M. & Rodewald H.R. (2007) Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *The Journal of Experimental Medicine*, **204**, 2629.
193. Pejler G., Söderström K. & Karlström A. (1994) Inactivation of thrombin by a complex between rat mast-cell protease 1 and heparin proteoglycan. *The Biochemical Journal*, **299**, 507.

194. Pejler G., Ronnberg E., Waern I. & Wernersson S. (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*, **115**, 4981.
195. Kalesnikoff J G.S. (2010) Anaphylaxis: Mechanisms of Mast Cell Activation. *Anaphylaxis. Chem Immunol Allergy*, **95**, 45.
196. Marshall J.S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. **4**, 787.
197. Kubes P. & Kanwar S. (1994) Histamine Induces Leukocyte Rolling in Post-Capillary Venules. A P-Selectin-Mediated Event. *Journal of Immunology*, **153**, 3570.
198. Razin E., Mencia-Huerta J., Stevens R., Lewis R., Liu F., Corey E. & Austen F. (1983) IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan. beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **157**, 189.
199. Boesiger J., Tsai M., Maurer M., Yamaguchi M., Brown L., Claffey K., Dvorak H. & Galli Stephen J. (1998) Mast Cells Can Secrete Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Exhibit Enhanced Release after Immunoglobulin E-dependent Upregulation of Fcε Receptor I Expression. *Journal of Experimental Medicine*, **188**, 1135.
200. Möller A., Lippert U., Lessmann D., Kolde C., Hamann K., Welker P., Schadendorf D., Rosenbach T., Luger T. & Czarnetzki B. (1993) Human Mast Cells Produce IL-8. *The Journal of Immunology*, **151**, 3216.
201. Tonnel A., Gosset P., Molet S., Tillie-Leblond I., Jeannin P. & Joseph M. (1996) Interactions Between Endothelial Cells and Effector Cells in Allergic Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **9**.
202. Gordon J.R. & Galli S.J. (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-[α]/cachectin. *Nature*, **346**, 274.
203. Kneilling M., Mailhammer R., Hultner L., Schonberger T., Fuchs K., Schaller M., Bukala D., Massberg S., Sander C.A., Braumüller H., Eichner M., Maier K.L., Hallmann R., Pichler B.J., Haubner R., Gawaz M., Pfeffer K., Biedermann T. & Rocken M. (2009) Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood*, **114**, 1696.
204. Malaviya R. & Abraham S. (2000 ) Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis *Journal of Leukocyte Biology* **67** 841.
205. Gaboury J., Johnston B., Niu X. & Kubes P. (1995 ) Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo *The Journal of Immunology* **154** 804.
206. van Haaster C.M.C.J., Derhaag J.G., Engels W., Lemmens P.J.M.R., Gijzen A.P., Hornstra G., van der Vusse G.J. & Duijvestijn A.M. (1997) Mast cell-mediated induction of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells in vitro: constitutive release of inducing mediators but no effect of degranulation. In: *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 435, p. 137. Springer Berlin / Heidelberg.
207. Malik AB F.J.n. (1992) Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **18**, 193.
208. Rosenberg R.D. & Damus P.S. (1973 ) The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor *Journal of Biological Chemistry* **248** 6490.
209. Hoylaerts M., Owen W.G. & Collen D. (1984) Involvement of Heparin Chain Length in the Heparin-catalyzed Inhibition of Thrombin by Antithrombin III. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 5670.
210. McLean K., Schirm S., Johns A., Morser J. & Light D.R. (2001) FXa-Induced Responses in Vascular Wall Cells are PAR-Mediated and Inhibited by ZK-807834. *Thrombosis Research*, **103**, 281.
211. Reynolds D., Gurley D., Austen K. & Serafin W. (1991) Cloning of the cDNA and gene of mouse mast cell protease-6. Transcription by progenitor mast cells and mast cells of the connective tissue subclass. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 3847.
212. McNeil H.P., Reynolds D.S., Schiller V., Ghildyal N., Gurley D.S., Austen K.F. & Stevens R.L. (1992 ) Isolation, characterization, and transcription of the gene

- encoding mouse mast cell protease 7 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11174.
213. Schwartz L.B., Sakai K., Bradford T.R., Ren S., Zweiman B., Worobec A.S. & Metcalfe D.D. (1995) The  $\alpha$  Form of Human Tryptase Is the Predominant Type Present in Blood at Baseline in Normal Subjects and Is Elevated in Those with Systemic Mastocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, **96**, 2702.
214. Mirza H., Schmidt V.A., Derian C.K., Jesty J. & Bahou W.F. (1997) Mitogenic Responses Mediated Through the Proteinase-Activated Receptor-2 Are Induced by Expressed Forms of Mast Cell  $\alpha$  - or  $\beta$  -Tryptases. *Blood*, **90**, 3914.
215. Frungieri M.B., Weidinger S., Meineke V., Köhn F.M. & Mayerhofer A. (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR $\gamma$ : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15072.
216. Lu C., Czhao F.-d., Cui X.-b. & Yin L.-h. (2005) Up-regulation of interleukin-8 expressions induced by mast cell tryptase via protease activated receptor-2 in endothelial cell line. *Chinese Medical Journal*, **118**, 1900.
217. Cottrell G.S., Amadesi S., Schmidlin F. & Bunnett N.W. (2003) Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 1191.
218. Levi-Schaffer F. & Piliponsky A.M. (2003) Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends in Immunology*, **24**, 158.
219. Itoh Y., Yanagisawa M., Ohkubo S., Kimura C., Kosaka T., Inoue A., Ishida N., Mitsui Y., Onda H., Fujino M. & Masaki T. (1988) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: Identity of human and porcine endothelin. *FEBS Letters*, **231**, 440.
220. Ehrenreich H., Burd P., Rottem M., Hültner L., Hylton J., Garfield M., Coligan J., Metcalfe D. & Fauci A. (1992) Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *The New Biologist*, **4**, 147.
221. Boros M.I., Szalay L.s. & Kaszaki J.z. (2002) Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation and tissue injury via ETA receptors. *Clinical Science*, **103 Suppl 48**, 31S.
222. Murray D.B., Gardner J.D., Brower G.L. & Janicki J.S. (2004) Endothelin-1 mediates cardiac mast cell degranulation, matrix metalloproteinase activation, and myocardial remodeling in rats. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, **287**, H2295.
223. Yamamura H., Nabe T., Kohno S. & Ohata K. (1994) Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *European Journal of Pharmacology*, **265**, 9.
224. Yamamura H N.T., Kohno S, Ohata K. (1994) Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C4 from mouse bone marrow-derived mast cells. *European Journal of Pharmacology*, **257**, 235.
225. Ohuchi N., Hayashi K., Iwamoto K., Koike K., Kizawa Y., Nukaga M., Kakegawa T. & Murakami H. (2010) Thrombin-stimulated proliferation is mediated by endothelin-1 in cultured rat gingival fibroblasts. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **24**, 501.
226. Yukelson LY T.G., Thomassen MC, Hemker HC, Rosing J. (1991) Procoagulant activities in venoms from central Asian snakes. *Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology*, **29**, 491.
227. Bauer O. & Razin E. (2000) Mast Cell-Nerve Interactions. *News in physiological sciences*, **15**, 213.
228. Bienenstock J T.M., Matsuda H, Stead RH, Quinonez G, Simon GT, Coughlin MD, Denburg JA. (1987) The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *International Archives of Allergy and applied immunology*, **82**, 238.
229. Steinhoff M V.N., Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P,

- Mayer EA, Bunnett NW. (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nature medicine*, **6**, 151.
230. Lowmann M., Benyon R. & Church M. (1988) Characterization of neuropeptide-induced release from human dispersed skin mast cells. *British Journal of Pharmacology*, **95**, 121.
231. Hanifin J.M. & Rogge J.L. (1977) Staphylococcal Infections in Patients With Atopic Dermatitis. *Archives of dermatology*, **113**, 1383.
232. Leung D. & Bieber T. (2003) Atopic dermatitis. *Lancet*, **361**, 151.
233. Wegrzynowicz Z H.P., Drapeau GR, Jeljaszewicz J, Pulverer G. (1980) Prothrombin activation by a metalloprotease from Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*, **12**, 138.
234. Pulverer G W.Z., Ko HL, Jeljaszewicz J. (1980) Influence of Pseudomonas aeruginosa proteases on prothrombin, plasminogen and fibrinogen. *Zentralblatt für Bakteriologie, 1. Abt. Originale A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, **248**, 99.
235. Lourbakos A., Chinni C., Thompson P., Potempa J., Travis J., Mackie E.J. & Pike R.N. (1998) Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from Porphyromonas gingivalis. *FEBS Letters*, **435**, 45.
236. Dulon S., Leduc D., Cottrell G.S., D'Alayer J., Hansen K.K., Bunnett N.W., Hollenberg M.D., Pidard D. & Chignard M. (2005) Pseudomonas aeruginosa Elastase Disables Proteinase-Activated Receptor 2 in Respiratory Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **32**, 411.
237. Maurer M., Kostka S.L., Siebenhaar F., Moelle K., Metz M., Knop J. & von Stebut E. (2006) Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections. *The FASEB Journal*, **20**, 2460.
238. Dudeck A., Suender C.A., Kostka S.L., von Stebut E. & Maurer M. (2011) Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology*, n/a.

## 9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Marcus Maurer. Er ermöglichte das Anfertigen einer Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durch die Bereitstellung eines interessanten Themas sowie für seine Unterstützung und gute fachliche Betreuung.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Anne Dudeck für ihr Engagement während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit. Sie stand mir stets mit ihrem fachlichen Wissen sowie mit Zeit für Diskussionen, Anregungen und Ermunterung zur Seite.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mitstreiterin Mandy Leist für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, im Büro und auch außerhalb der Arbeit, ebenso für die Ruhe und Zuversicht, die sie mir gab. Sie fand immer Zeit für eine fachliche Auseinandersetzung, praktische Unterstützung oder einen gemütlichen Nachmittagskaffee.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Maurer für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, vor allem Sina Heydrich, Marina Frömming und Stefanie Gemeiner für die herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Dr. Martin Metz danke ich für seine zur jeder Zeit vorhandene Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Magnus Åbrink von der Universität Uppsala danke ich für die unkomplizierte Hilfe und Unterstützung in einer entscheidenden Phase meiner Arbeit.

Dennis Ernst und Sven Guhl gilt mein Dank für ihr stets offenes Ohr bei methodischen Schwierigkeiten einschließlich der vielen fachlichen Tipps und Kniffe. Nicht zu vergessen möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Worm bedanken, allen voran Christin Weise, Kerstin Geldmeyer und Björn Hartmann für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gute Laune innerhalb und außerhalb des Labors.

Bei Dr. Florian Losch möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und seinen fachlichen Rat bedanken.

Danken möchte ich auch Diana Pauly und Heidrun Ranisch für gemeinsame Stunden abseits vom Forschungsalltag und ihrer stetigen Zuversicht, moralische Unterstützung und Rückhalt während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

---

Katharina Duchardt danke ich für ihre stetige Aufmunterung und tiefe Freundschaft seit dem Beginn unseres Studiums.

Nicht zu vergessen danke ich meiner Schwester Uta für die guten Gespräche und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen. Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern für die volle Unterstützung Zeit meines Lebens, besonders seit dem Beginn meines Studiums und während meiner Zeit als Doktorandin. Ihre Liebe und Zuversicht gaben mir Kraft und motivierten mich nicht zuletzt fortlaufend, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Andreas für seine unerschütterliche Geduld, Kraft und Liebe bedanken.

## 10 VERÖFFENTLICHUNGEN

### Publikation

Anne Dudeck, Cathleen A. Sünder, Susanna Lopez Kostka, Esther von Stebut, Marcus Maurer. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. Eur J Immunol. 2011 Apr 14.

### Poster

- |                     |  |
|---------------------|--|
| 19.02. – 23.02.2011 | ADF Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Tübingen; <b>Poster:</b> “Mast cells are critical for the limitation of thrombin-induced inflammation”; <u>C.A. Sünder</u> , M. Leist, M. Åbrink, M. Steinhoff, A. Dudeck, and M. Maurer        |
| 09.12. – 10.12.2010 | MCBM International Mast Cell and Basophil Meeting, Berlin; <b>Poster:</b> “Mast cells are critical for the limitation of thrombin-induced inflammation”  |
| 18.02. – 20.02.2010 | ADF Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Lübeck; <b>Poster:</b> Modulation of mast cell biology by thrombin via proteinase-activated receptors (PARs); <u>C.A. Sünder</u> , M. Leist, S. Seeliger, M. Steinhoff, M. Maurer and A. Dudeck |
| 13.09. – 16.09.2009 | ECI 2 <sup>nd</sup> European Congress of Immunology; Berlin <b>Poster:</b> “Impact of thrombin on murine mast cell function via Proteinase-activated receptors”; <u>C.A. Sünder</u> , M. Grusser, S. Seeliger, M. Steinhoff, M. Maurer, A. Dudeck  |
| 10.09.-12.09.2009   | ESDR European Society for Dermatological Research, Budapest; <b>Poster:</b> “Impact of thrombin on murine mast cell function via Proteinase-activated receptors”; <u>C.A. Sünder</u> , M. Grusser, S. Seeliger, M. Steinhoff, M. Maurer, A. Dudeck |
| 28.02. – 01.03.2008 | ADF, Treffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Erlangen; <b>Poster:</b> „Mature mast cells induce dendritic cell maturation resulting in T cell proliferation and   |

polarization to TH1 response“; A. Dudeck, C.A. Sünder, S. Heydrich and M. Maurer;

05.09. – 08.09.2007 ESDR European Society for Dermatology Research, Zürich,  
**Poster:** “Murine mast cells express Proteinase-activated receptors 1-4 and migrate towards their ligands” CA. Sünder, M. Grusser, M. Steinhoff, A. Dudeck, M. Maurer

### **Vorträge**

09.12. – 10.12.2010 MCBM International Mast Cell and Basophil Meeting, Berlin;  
**Vortrag:** “Mast cells are critical for the limitation of thrombin-induced inflammation”

19.03. – 20.03.2009 Mainzer Allergie Workshop **Vortrag:** “Mast cells promote TH1 immune response by modulation of dendritic cell function”; A. Dudeck, C.A. Sünder, S. Heydrich, M. Maurer

07.03. – 08.03.2008 Mainzer Allergie Workshop **Vortrag:** “Murine mast cell proliferation and apoptosis is regulated by activation of Proteinase-activated receptors; C.A. Sünder, M. Grusser, S. Seeliger, M. Steinhoff, M. Maurer, A. Dudeck

06.12. – 07.12.2007 Treffen der AG Mastzellen und Basophile der ADF, München  
**Vortrag:** “Proteinase activated receptor (PAR) agonists as modulators of mast cell biology”



**11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einem akademischen Grad erworben oder zu erweben versucht.

Berlin; den 28.04.2011

---